

10/534002

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2004 年 5 月 21 日 (21.05.2004)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2004/042055 A1

(51) 国際特許分類: C12N 15/00,
9/24, 9/38, C12Q 1/68, A01K 67/00

(21) 国際出願番号: PCT/JP2003/014211

(22) 国際出願日: 2003 年 11 月 7 日 (07.11.2003)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2002-323438 2002 年 11 月 7 日 (07.11.2002) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 独立
行政法人産業技術総合研究所 (NATIONAL INSTI-
TUTE OF ADVANCED INDUSTRIAL SCIENCE AND
TECHNOLOGY) [JP/JP]; 〒100-8921 東京都千代田区
霞が関 1-3-1 Tokyo (JP). アマシャムバイオサイ

エンス株式会社 (AMERSHAM BIOSCIENCES K.K.)
[JP/JP]; 〒169-0073 東京都新宿区百人町 3-2 5-1
Tokyo (JP).

(72) 発明者; および

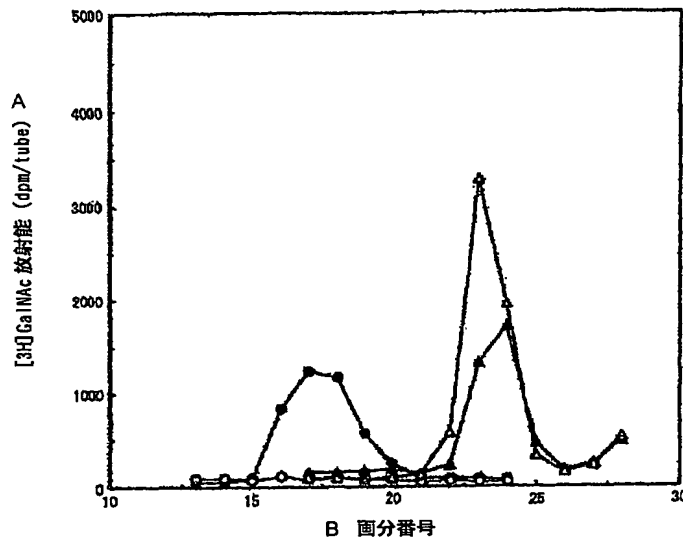
(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 成松 久 (NARI-
MATSU, Hisashi) [JP/JP]; 〒305-8568 茨城県つくば市
梅園 1-1-1 中央第 2 独立行政法人産業技術総合
研究所内 Ibaraki (JP). 佐藤 隆 (SATO, Takashi) [JP/JP];
〒305-8568 茨城県つくば市梅園 1-1-1 中央第 2
独立行政法人産業技術総合研究所内 Ibaraki (JP). 後
藤 雅式 (GOTOH, Masanori) [JP/JP]; 〒305-8568 茨城
県つくば市梅園 1-1-1 中央第 2 独立行政法人産
業技術総合研究所内 Ibaraki (JP).

(74) 代理人: 社本 一夫, 外 (SHAMOTO, Ichio et al.); 〒
100-0004 東京都千代田区大手町二丁目 2 番 1 号 新大
手町ビル 206 区ユアサハラ法律特許事務所 Tokyo
(JP).

[続葉有]

(54) Title: METHOD OF DETECTING BONE PAGET' S DISEASE

(54) 発明の名称: 骨パジェット病の検出方法



A...[3H]GalNAc RADIOACTIVITY (dpm/tube)
B...FRACTION NO.

(57) Abstract: It is intended to provide a method of detecting bone Paget' s disease and an animal presenting pathological con-
ditions of bone Paget' s disease. Association of a mutation or expression dose of chondroitin/chondroitin sulfate synthase gene
comprising an amino acid sequence represented by any of SEQ ID NOS:2, 4, 6, 66, 68 and 70 with bone Paget' s disease; detec-
tion of bone Paget' s disease; and a knockout animal obtained by knocking out the above-described chondroitin/chondroitin sulfate
synthase gene.

[続葉有]

WO 2004/042055 A1



(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ

特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(57) 要約: 骨パジェット病の検出方法、及び骨パジェット病の病態を示す動物を提供する。配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号66、配列番号68及び配列番号70の何れかに記載されたアミノ酸配列からなるコンドロイチン/コンドロイチン硫酸合成酵素の遺伝子の変異又はこれらの発現量と、骨パジェット病との関連づけ、骨パジェット病の検出、及び前記コンドロイチン/コンドロイチン硫酸合成酵素の遺伝子をノックアウトして得られる、ノックアウト動物。

明細書

骨パジェット病の検出方法

技術分野

- 5 本発明は、骨パジェット病の検出方法に関連し、より詳細にはコンドロイチン／コンドロイチン硫酸の合成に関与する酵素の遺伝子の変異又は発現量と、骨パジェット病とを関連づける骨パジェット病の検出方法に関する。

背景技術

- 10 骨パジェット病は破骨細胞と骨芽細胞とが共に増加し、骨吸収とそれに伴う二次的な骨形成が局所的に異常に亢進し、骨の変形や肥厚を来す疾病である。この疾病はウイルス感染症が引き金となって発症するという説が有力であり、患者の末梢血液と骨髓の単核球から抽出したRNAを使用して逆転写ポリメラーゼチェーンリアクション法（RT-PCR法）で麻疹ウイルスを検出できたことが非特許文献1
- 15 には記載されている。しかし、麻疹ウイルスが直接骨パジェット病を引き起こすことは示されておらず、骨パジェット病の病態を引き起こす原因は不明である。この疾病の患者は我が国に於いては希であるが、欧米には多くの患者がおり、高齢となるほど高い発症率となること、女性よりも男性で発症率が高いことが非特許文献2には記載されている。
- 20 また、骨パジェット病の原因となる変異遺伝子座は既に公知で非特許文献3に記載されているが、この遺伝子座にはいくつもの遺伝子が存在し、何れの遺伝子に変異を来した場合に骨パジェット病となるのかは知られていなかった。従って、簡便な方法で骨パジェット病の診断を行うためには、何れの遺伝子に変異を来した場合に当該疾病が発症するのかを解明する必要があった。

25

発明の開示

骨パジェット病の病態を引き起こす原因遺伝子を解明し、骨パジェット病の簡便な検出方法に対する期待が高まっていた。

図面の簡単な説明

図1は、K3のGalNAc転移活性による奇数糖の合成を示すクロマトグラフィーのチャートを示す図である。白丸はコンドロイチン硫酸に対するGalNAc転移活性を示すチャートであり、黒丸はコンドロイチンに対するGalNAc転移活性を示す図である。白三角はコンドロイチン硫酸10糖に対するGalNAc転移活性を示すチャートで α 、黒三角はコンドロイチン10糖に対するGalNAc転移活性を示すチャートである。

図2は、K3のGalNAc転移活性により調製された11糖とそのコンドロイチナーゼACII消化物のクロマトグラフィーのチャートを示す図である。白丸はコンドロイチナーゼACII未消化の11糖のチャートを示し、黒丸はコンドロイチナーゼACII消化後の消化産物のチャートを示す。

図3は、K3のGlcUA転移活性による偶数糖の合成を示すクロマトグラフィーのチャートを示す図である。白丸はコンドロイチン硫酸に対するGlcUA転移活性を示すチャートであり、黒丸はコンドロイチンに対するGlcUA転移活性を示すチャートである。白三角はコンドロイチン硫酸11糖に対するGlcUA転移活性を示すチャートであり、黒三角はコンドロイチン11糖に対するGlcUA転移活性を示すチャートである。

図4は、K3のGlcUA転移活性により調製された12糖とそのコンドロイチナーゼACII消化物のクロマトグラフィーのチャートを示す図である。白丸はコンドロイチナーゼACII未消化の12糖のチャートを示し、黒丸はコンドロイチナーゼACII消化後の消化産物のチャートを示す。

図5は、K11のGalNAc転移活性による奇数糖の合成を示すクロマトグラフィーのチャートを示す図である。白丸はコンドロイチン硫酸に対するGalNAc転移活性を示すチャートであり、黒丸はコンドロイチンに対するGalNAc転移活性を示す図である。白三角はコンドロイチン硫酸10糖に対するGalNAc転移活性を示すチャートで α 、黒三角はコンドロイチン10糖に対するGalNAc転移活性を示すチャートである。

図6は、K11のGalNAc転移活性により調製された11糖とそのコンドロイチナーゼACII消化物のクロマトグラフィーのチャートを示す図である。白丸はコンドロ

イチナーゼACII未消化の11糖のチャートを示し、黒丸はコンドロイチナーゼACII消化後の消化産物のチャートを示す。

図7は、K11のGlcUA転移活性による偶数糖の合成を示すクロマトグラフィーのチャートを示す図である。白丸はコンドロイチン硫酸に対するGlcUA転移活性を示すチャートであり、黒丸はコンドロイチンに対するGlcUA転移活性を示すチャートである。白三角はコンドロイチン硫酸11糖に対するGlcUA転移活性を示すチャートであり、黒三角はコンドロイチン11糖に対するGlcUA転移活性を示すチャートである。

図8は、K11のGlcUA転移活性により調製された12糖とそのコンドロイチナーゼACII消化物のクロマトグラフィーのチャートを示す図である。白丸はコンドロイチナーゼACII未消化の12糖のチャートを示し、黒丸はコンドロイチナーゼACII消化後の消化産物のチャートを示す。

発明の詳細な説明

本発明者等は上記課題を解決するために鋭意検討した結果、骨パジェット病の遺伝子変異が何れもコンドロイチン／コンドロイチン硫酸の合成に関与するDNAの遺伝子座に起こっていることを発見し、これを骨パジェット病の検出に応用して本発明を完成した。

すなわち、本発明の要旨はコンドロイチン合成酵素をコードする遺伝子の変異又は発現量と、骨パジェット病とを関連づけることを特徴とする骨パジェット病の検出方法である。

発明を実施するための形態

以下、発明の実施の形態により本発明を詳説する。

本発明検出方法は、コンドロイチン合成酵素遺伝子の変異又は発現量と、骨パジェット病とを関連づけることを特徴とする骨パジェット病の検出方法である。

本発明検出方法に於ける「コンドロイチン合成酵素」とは、コンドロイチン又はコンドロイチン硫酸の合成に関与する酵素である限りに於いて特に限定はされない。つまりコンドロイチンやコンドロイチン硫酸は通常はプロテオグリカンと

して生体内で合成されるので、コンドロイチン/コンドロイチン硫酸の基本骨格の伸長に關与する酵素のみならず、例えばプロテオグリカンのタンパク質とグリコサミノグリカンの連結部分を合成する酵素等も包含する。このような酵素が変異を起こしたり、発現がなされないとコンドロイチン/コンドロイチン硫酸の合成がなされない。

このような本発明検出方法における「コンドロイチン合成酵素」は、「コンドロイチン/コンドロイチン硫酸の非還元末端の糖残基に対してD-グルクロン酸残基又はN-アセチル-D-ガラクトサミン残基を転移する活性を有する糖転移酵素」

(便宜上、以下「糖転移酵素1」とも記載する)又は「『アミノ酸残基に結合したキシロース残基』にD-ガラクトースを $\beta 1,4$ グリコシド結合で結合させる糖転移酵素」(便宜上、以下「糖転移酵素2」とも記載する)であることが好ましい。

上述の「糖転移酵素1」とは、「コンドロイチン/コンドロイチン硫酸の非還元末端の糖残基に対してD-グルクロン酸(以下単に「GlcUA」とも記載する)残基又はN-アセチル-D-ガラクトサミン(以下単に「N-アセチルガラクトサミン」又は「GalNAc」とも記載する)残基を転移する活性」を有する限りにおいて特に限定はされない。このような糖転移酵素1はコンドロイチン/コンドロイチン硫酸の伸長に關与しており、このような酵素に変異又は発現の抑制が起こると正常なコンドロイチン/コンドロイチン硫酸の生合成が妨げられ、骨形成に異常を来す骨パジェット病に繋がると考えられる。

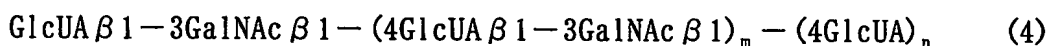
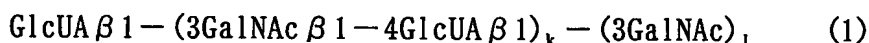
上記「糖転移酵素1」における「コンドロイチン」とは、ウロン酸(以下単に「UA」とも記載する)残基とGalNAc残基とが $1,3$ グリコシド結合で結合した二糖が、 $\beta 1,4$ グリコシド結合で繰り返して結合してなる基本骨格(すなわち $-[4UA1-3GalNAc\beta 1-]_n$: n は2以上の整数を示す)を有するグリコサミノグリカンの一種である。「コンドロイチン」はこの基本骨格に硫酸基が結合していないが、「コンドロイチン硫酸」はGalNAc残基の2位、4位、又は6位、又はウロン酸残基の2位の炭素原子が硫酸化されている。

「コンドロイチン/コンドロイチン硫酸の非還元末端の糖残基」とは、コンドロイチン/コンドロイチン硫酸の基本骨格を構成するGalNAc残基及びUA残基の何

れかであり、「糖転移酵素 1」は、上記糖残基がGalNAc残基の場合はUAを転移し、上記糖残基がUA残基の場合はGalNAcを転移するが、何れか一方の転移活性を少なくとも有している酵素である。

5 このような「糖転移酵素 1」の具体例としては、「配列番号 2 記載のアミノ酸番号 1 乃至 882 からなるアミノ酸配列からなるタンパク質を含むコンドロイチン合成酵素」が挙げられる。

当該酵素は下記式 1 で示される構造を含むGalNAc受容体にGalNAc供与体基質（例えばUDP-GalNAc）からGalNAc残基を転移し、下記式 2 で示される構造を含む化合物を合成する活性を有すると共に、下記式 3 で示される構造を含むGlcUA受容
10 体にGlcUA供与体基質（例えばUDP-GlcUA）からGlcUA残基を転移し、下記式 4 で示される構造を含む化合物を合成する活性を有する（本明細書中参考例 2 参照）。



式 1 乃至 4 中、「-」はグリコシド結合を示し、数字は前記グリコシド結合が存在する糖環の炭素位置を示す。また「 α 」及び「 β 」は糖環 1 位の前記グリコシド結合のアノマーを示し、5 位 CH_2OH 又は COOH との位置関係がトランスのものを「 α 」、シスのものを「 β 」で示す。k 及び m は 1 以上の整数を示し、l 及び n は 1 又は 0 を示す。
20

塩基配列（配列番号 1）からなる当該酵素遺伝子は OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man) を使用して遺伝子座を調べると 5q31.1 に存在することが明らかとなった（参考例 1 参照）。
25

また「糖転移酵素 1」の他の例としては、例えば「配列番号 4 記載のアミノ酸番号 1 乃至 755 からなるアミノ酸配列からなるタンパク質を含むコンドロイチン合成酵素」が挙げられる。

当該酵素は前記式 1 で示される構造を含むGalNAc受容体にGalNAc供与体（例えばUDP-GalNAc）からGalNAc残基を転移し、前記式 2 で示される構造を含む化合物を合成する活性を有すると共に、前記式 3 で示される構造を含むGlcUA受容体にGlcUA供与体（例えばUDP-GlcUA）からGlcUA残基を転移し、前記式 4 で示される構造を含む化合物を合成する活性を有する（本明細書中参考例 4 参照）。

塩基配列（配列番号 3）からなる当該酵素遺伝子はOMIMを使用して遺伝子座を調べると遺伝子座を調べると2q36.3に存在することが明かとなった（本明細書中参考例 3 参照）。

なお、「コンドロイチンの非還元末端の糖残基に対してGlcUA残基又はGalNAc残基を転移する活性」は、例えば放射能などで標識したGlcUA供与体基質又はGalNAc供与体基質と、放射能で標識していないコンドロイチン/コンドロイチン硫酸（これらを低分子化して得られる低分子コンドロイチン/低分子コンドロイチン硫酸（20糖以下の糖鎖）も含む）の受容体基質とを用いて、酵素反応させた後、反応生成物についてゲル濾過とオートラジオグラフやシンチレーションカウンターなどを用いることで容易に検出することができる。上記GlcUA供与体基質としては、GlcUAを有する糖ヌクレオチドであることが好ましく、例えばアデノシン二リン酸-D-グルクロン酸（ADP-GlcUA）、ウリジン二リン酸-D-グルクロン酸（UDP-GlcUA）、グアノシン二リン酸-D-グルクロン酸（GDP-GlcUA）、シチジン二リン酸-D-グルクロン酸（CDP-GlcUA）等が例示され、UDP-GlcUAが最も好ましい。生体内ではUDP-GlcUAがGlcUA供与体基質として働いているからである。

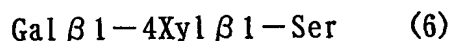
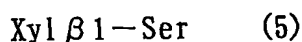
また、上記GalNAc供与体基質としては、GalNAcを有する糖ヌクレオチドであることが好ましく、例えばアデノシン二リン酸-N-アセチル-D-ガラクトサミン（ADP-GalNAc）、ウリジン二リン酸-N-アセチル-D-ガラクトサミン（UDP-GalNAc）、グアノシン二リン酸-N-アセチル-D-ガラクトサミン（GDP-GalNAc）、シチジン二リン酸-N-アセチル-D-ガラクトサミン（CDP-GalNAc）等が例示され、UDP-GalNAcが最も好ましい。生体内ではUDP-GalNAcがGalNAc供与体基質として働いているからである。

上記「糖転移酵素 2」は「『アミノ酸残基に結合したキシロース残基』にD-ガラクトース（以下単に「ガラクトース」又は「Gal」とも記載する）を β 1,4グリ

コシド結合で転移する働きを有する糖転移酵素」である限りに於いて特に限定はされない。このような糖転移酵素 2 はコンドロイチン／コンドロイチン硫酸の生成初期の段階に関与しており、このような酵素に変異が起こると正常なコンドロイチン／コンドロイチン硫酸の生合成が妨げられるため、骨形成に異常を来す骨パジェット病に繋がると考えられる。

上記「糖転移酵素 2」に於ける「アミノ酸残基」とは、ペプチド（タンパク質）を形成するアミノ酸であることが好ましく、特に生体内に存在するコンドロイチン／コンドロイチン硫酸プロテオグリカンの構造中、ペプチド（タンパク質）とコンドロイチン／コンドロイチン硫酸との結合部分に存在する特徴的四糖構造（GlcUA β 1-3Gal β 1-3Gal β 1-4Xyl：以下「リンケージ四糖」と記載する）の還元末端に存在するキシロースが結合しているアミノ酸が最も好ましい。このようなアミノ酸として最も好ましくはL-セリンが例示される。

すなわち「糖転移酵素 2」は下記式 5 で示される構造を含むGal受容体にGal供与体基質（例えばUDP-Gal）からGal残基を転移し、下記式 6 で示される構造を含む化合物を合成する活性を有する（本明細書中参考例 5 参照）。



上記式 5 及び 6 において、「Ser」は上記「Xyl」で示されるキシロース残基がその側鎖に結合したセリン残基（ペプチド鎖中の場合を含む）を示し、「Xyl」は前記「Ser」で示されるセリン残基の側鎖に結合したキシロース残基を示し、「-」、「 β 」、数字は前記式 1 乃至 4 と同じである。

塩基配列（配列番号 5）からなる当該酵素遺伝子はOMIMを使用して遺伝子座を調べると5q35に存在することが明かとなった（本明細書中参考例 5 参照）。

なお、「『アミノ酸残基に結合したキシロース残基』にGalを β 1,4グリコシド結合で転移する活性」は、例えば放射能などで標識したGal供与体基質と、放射能で標識していないキシロース結合ペプチド（例えば配列番号 15：第9番目のアミノ酸残基であるセリン残基に側鎖としてキシロースが結合しているピクニン

のN-末端配列：ペプチド研究所製）とを用いて反応させた後、反応生成物についてゲル濾過とオートラジオグラフやシンチレーションカウンターなどを用いることで容易に検出することができる。なお、上記Gal供与体基質としては、Galを有する糖ヌクレオチドであることが好ましく、例えばアデノシン二リン酸-D-ガラクトース（ADP-Gal）、ウリジン二リン酸-D-ガラクトース（UDP-Gal）、グアノシン二リン酸-D-ガラクトース（GDP-Gal）、シチジン二リン酸-D-ガラクトース（CDP-Gal）等が例示され、UDP-Galが最も好ましい。生体内ではUDP-GalがGal供与体基質として働いているからである。

骨パジェット病に於ける遺伝子の変異としては、例えば亜種であるPDB2においては18q22.1、PDB3においては5q35、PDB4においては5q31に変異が起こっていることが知られており（OMIM #602080）、また家族性の骨パジェット病に於ける遺伝子の変異として、2q36、10q13、及び5q35に変異が起こっていることが知られている（Am. J. Hum. Genet. 69(2001), pp.1055-1061）。このような既知の変異部位には数個乃至十数個の遺伝子がコードされているが、上述した各コンドロイチン合成酵素遺伝子の存在位置は配列番号1（K3）が5q31.1、配列番号3（K11）が2q36.3、そして配列番号5（ β 4GalT7）は5q35であり、上記変異の存在する位置と各々完全に一致している。このようにコンドロイチン/コンドロイチン硫酸の合成に関わるこれらの酵素の遺伝子が全て骨パジェット病の遺伝子変異部位と重複することから、これらの遺伝子の変異は、コンドロイチン/コンドロイチン硫酸の生合成に障害を起こして骨パジェット病の発症に繋がっている蓋然性が極めて高い。

本明細書において使用する用語「コンドロイチン合成酵素遺伝子の変異又は発現量と、骨パジェット病とを関連づける」とは、コンドロイチン合成酵素遺伝子の変異が検出された場合、又は該遺伝子の発現量が健常人と比べて低下した場合に骨パジェット病であると判断することをいう。

本明細書において使用する用語「遺伝子の変異」とは、遺伝子の構造変化をいい、「変異」には、点突然変異、逆位、欠失、挿入、重複、転座が含まれる。また、「変異遺伝子」とは、配列番号1、配列番号3、配列番号5、配列番号65、配列番号67、又は配列番号69に示される塩基配列において、1若しくは複

数個のヌクレオチドが置換し若しくは欠失し、又は該塩基配列に1若しくは複数個のヌクレオチドが挿入され若しくは付加された塩基配列を意味する。ここで、「複数個」とは、好ましくは2個以上、より好ましくは4個以上、さらにより好ましくは6個以上、最も好ましくは10個以上である。

- 5 コンドロイチン合成酵素遺伝子の変異の態様は、好ましくは点突然変異、欠失、挿入、逆位、重複、転座、より好ましくは、点突然変異、欠失、挿入、逆位、転座、さらに好ましくは、点突然変異、欠失、挿入、転座、最も好ましくは点突然変異、欠失、挿入である。

- 10 本明細書において使用する用語「遺伝子の発現」とは、典型的には、DNA又はその一部からRNAへの転写、又は該RNA又はその一部からタンパク質への翻訳をいう。従って、「遺伝子の発現量」というときは、遺伝子から転写されるRNAの量、又は該RNAから翻訳されるタンパク質の量をいう。

- 15 RNAの発現量は、例えば、後述する実施例1に記載した表1のプライマーを使用したPCR法を用いて定量することができる。PCR法では、定量的PCR法の使用が好ましく、キネティックス分析のためのRT-PCR法、定量的リアルタイムPCR法が例示される。本発明によれば、RNAの定量には、これらに限定されるものではなく、ノーザンブロット、ドットブロット、DNAマイクロアレイを使用することも可能である。一方、同一組織等に広く一般的に存在する遺伝子の核酸、例えばグリセルアルデヒド-3リン酸-脱水素酵素（GAPDH）、
- 20 β -アクチンをコードする核酸を対照として利用することができる。また、タンパク質の発現量は、例えば、ELISA法、ウェスタンブロットを用いて定量することができる。

本発明検出方法は具体的には以下の様にして行うことができる。

- 25 すなわち、例えば遺伝子を含む検体（例えば上皮組織、結合組織等、好ましくは結合組織が挙げられ、採取が極めて容易で、且つ得られた検体が新鮮であることから特に好ましくは血液が挙げられる）から、例えば既存のRNA調製キット（例えばRNA Extraction Kit：アマシャムバイオサイエンス株式会社製など）を用いて全RNAを抽出・精製することができる。抽出・精製された全RNAを用いてK3、K11、及び β 4Gal-T7の発現量を既存のキット（例えばSUPERScript First-Strand

Synthesis System for RT-PCR（インビトロジェン社製）等）を用いてRT-PCR法などの方法で定量することができる。使用する5'プライマー、3'プライマー、及びプローブの組み合わせの例としては、K3の発現量を定量する場合は配列番号56、配列番号57、配列番号58、K11の発現量を定量する場合は配列番号59、配列番号60、配列番号61、 β 4Gal-T7の発現量を定量する場合は配列番号62、配列番号63、配列番号64の組み合わせが挙げられるが、当業者であれば定量の目的に応じて適宜選択して調製することが可能である。

そして、例えばこれらの定量の結果、K3、K11及び β 4GalT7の何れかの遺伝子の発現が一部又は完全に抑制されている患者を骨パジェット病の危険性が高い患者とすることができる。また、上記定量は上記で例示したようにK3、K11及び β 4Gal-T7の遺伝子の転写量をRNA量から定量して行うこともできるが、例えば常法に従って調製したK3、K11又は β 4Gal-T7の抗体などを使用してK3、K11又は β 4Gal-T7のタンパク質量を直接定量して行うことも可能であり、また検体中の上記酵素の活性を直接測定して酵素量を定量して骨パジェット病と関連づけることも可能である。

より具体的には、後述する実施例2に記載されているように、骨パジェット病の患者の末梢血単核球と正常な末梢血単核球でのコンドロイチン合成酵素遺伝子の発現量の比を定量PCRによって測定することによって骨パジェット病と判断することができる。本発明によれば、骨パジェット病であると判断できる発現量の比は、 $1/2$ 以下、好ましくは $1/5$ 以下、さらにより好ましくは $1/10$ 以下である。なお、本明細書において使用される用語「測定」には、検出、増幅、定量、及び半定量のいずれもが包含される。

本発明によれば、コンドロイチン合成酵素遺伝子の変異の存在を確認することによって骨パジェット病を検出することができる。即ち、骨パジェット病の患者の末梢血単核球から抽出したコンドロイチン合成酵素遺伝子の塩基配列と正常な末梢血単核球から抽出したコンドロイチン合成酵素遺伝子の塩基配列とを比較し、変異の存在を検出することによって骨パジェット病であると判断することができる。より具体的には、後述する実施例1に記載されているように、本明細書配列表に記載されたK3、K11及び β 4Gal-T7の塩基配列を元に適宜調製したプライマ

一を用いてゲノムのDNAから直接K3、K11又は β 4Gal-T7の遺伝子をPCR法などの手法を用いて増幅し、公知の塩基配列決定法に従って塩基配列を解析し、これらの遺伝子に変異が存在する場合に骨パジェット病であると結論づけることが可能である。骨パジェット病であると判断できる変異したヌクレオチドの数は、1以上、好ましくは4以上、さらにより好ましくは6以上、最も好ましくは10以上である。

コンドロイチン合成酵素遺伝子の変異の態様は、好ましくは点突然変異、欠失、挿入、逆位、重複、転座、より好ましくは、点突然変異、欠失、挿入、逆位、転座、さらに好ましくは、点突然変異、欠失、挿入、転座、最も好ましくは点突然変異、欠失、挿入である。

また、本発明によりK3、K11及び β 4Gal-T7が骨パジェット病に関連していることが明かとなったので、実験動物において、これらの遺伝子の発現を一部又は完全抑制することによって骨パジェット病の病態を示すノックアウト動物を調製することも可能である。ノックアウト動物としては、例えば、マウス、ラット、ウサギ、イヌ、ネコ、サルなどの哺乳動物が好ましく、ノックアウト動物調製の手法がある程度確立していることから、マウス又はラットが最も好ましいが、これに限定はされない。

例えば骨パジェット病の病態を示すノックアウトマウス（病態マウス）は例えばジーンターゲティングの最新技術（八木健編集 羊土社）、ジーンターゲティング（野田哲生監訳 メディカル・サイエンス・インターナショナル社）などの記載に従って行うことができる。

例えば、ノックアウトしたいマウスの遺伝子（K3（mK3：配列番号65）、K11（mK11：配列番号67）又は β 4Gal-T7（m β 4Gal-T7：配列番号69））の活性化ドメインを含むexon（mK3の場合にはORF部分の3番目のexon（1560 bp）を含む断片、mK11の場合にはORF全長に相当する4598bpを含む断片、m β 4Gal-T7の場合にはORFの2から6番目のexonを含む断片）を中心とした染色体断片（約10kb）を挿入した直鎖状ターゲティングベクター80 μ gをES細胞（E14/129Svマウス由来）にエレクトロポレーション法などの公知の方法により導入し、G418耐性のコロニーを選択し、このG418耐性コロニーを24ウェルプレートに移して培養を行うこ

とができる。細胞の一部を凍結保存した後、残りのES細胞からDNAを抽出し、公知の塩基配列解析方法により組換えが起こっているクローンを120コロニー程度選択する。さらに、サザンブロッティング法などの方法を用いて組換えが予定通り起こっている確認を行い、最終的に組換え体を10クローン程度選択し、そのうちの2クローン程度のES細胞をC57BL/6マウスの胚盤胞内に注入する。このようにしてES細胞を注入したマウス胚を仮親マウスの子宮内へ移植してキメラマウスを誕生させることができる。キメラマウスをジャームトランスミッションによりヘテロノックアウトマウスを得ることができる。

また、small interfering RNA法 (T.R. Brummelkamp et al., Science, 296, 550-553 (2002)) などの「遺伝子発現を抑制する方法」でもノックアウトマウスを作製することができる。

より具体的には、後述する実施例3に記載されているように、ノックアウトマウスは、コンドロイチン合成酵素遺伝子をES細胞に導入し、目的とする相同組換えを起こしたクローンを用いて生殖細胞系系に入るマウス系系を樹立することにより作製することができる。

実施例

以下、実施例により本発明をより具体的に説明する。

参考例1：コンドロイチン硫酸合成酵素 (K3) の調製

(1) cDNAのクローニングと発現ベクターの構築

β 1,4ガラクトース転移酵素 (β 4Gal-T) のアミノ酸配列 (GenBank accession No. D29805がコードするアミノ酸配列) をクエリーとして、BLAST検索を行った。その結果、Expression Sequence Tag (EST: GenBank accession No. AC0004219) が見つかった。しかし、この配列は不完全であったため、ゲノムデータベースから、GenScan (米国スタンフォード大学) によりORFを調べた。その結果、配列番号1記載の塩基配列 (コードされるアミノ酸配列は配列番号2) を発見した。配列番号1記載の塩基配列からなる遺伝子は、少なくともヒト脳で発現していることをMarathon-Ready cDNA (クロンテック社製) を鋳型としたRT-PCR法によって確認した (PCR用のプライマーとしては配列番号9及び配列番号10、並びに

配列番号 1 1 及び配列番号 1 2 の 5' プライマーと 3' プライマーとの組み合わせを使用した。この遺伝子の膜貫通領域を含む領域（配列番号 2 のアミノ酸番号 1 乃至 129 からなる領域）を除く可溶性領域をクローニングするため、配列番号 7 及び配列番号 8 の 2 種のプライマーを用いて常法に従って PCR を行った。使用した鋳型 cDNA は Marathon-Ready cDNA human brain（クロンテック社製）を使用した。増幅された約 2.3 kb のバンドを常法に従って HindIII と XbaI とで消化し、ほ乳類細胞用の発現ベクター pFLAG-CMV-1（シグマ社製）の HindIII と XbaI 部位に常法に従って挿入して発現ベクター（K3-FLAG-CMV1）を得た。得られた発現ベクターの塩基配列を確認したところ、配列番号 1 記載の塩基配列の塩基番号 388 乃至 264 9 の塩基配列からなる DNA 断片が挿入されていることを確認した。この塩基配列を有する DNA のゲノム上の位置を、OMIM を使用して確認したところ、5q31.1 に存在することが明かとなった。

(2) K3 の調製

K3-FLAG-CMV1 15 μ g を TransFast（プロメガ社製）を用い、プロトコールに従って、100 mm 培養皿に 70 コンフルエントになるように培養した COS7 細胞に遺伝子を導入した。3 日間培養した上清を回収し、0.22 μ m のフィルターで濾過後、その上清 10 ml に Anti-FLAG M2-Agarose Affinity Gel（シグマ社製）100 μ l を加え、4℃ で一晩、転倒混和した。反応後、ゲルを 50 mM Tris-HCl、pH 7.4/20 グリセロールで 3 回洗浄後、27G の注射針をつけたシリンジを用い余分な洗浄液を除いた。このゲルを 50 mmol/L Tris-HCl、pH 7.4（20 グリセロール、10 mmol/L フェニルメチルスルホニルフルオリド、1 μ g/ml leupeptin、1 μ g/ml pepstatin）に 50 (v/v) となるように懸濁し、これを遠心分離した後に上清を取り除いて酵素吸着ゲル懸濁液とした。

25 参考例 2

K3 を用いたコンドロイチン骨格の伸長

(1) コンドロイチン／コンドロイチン硫酸奇数糖の調製

コンドロイチン（サメ軟骨由来コンドロイチン硫酸を化学的に脱硫酸化したもの：生化学工業株式会社製）及びコンドロイチン硫酸（サメ軟骨由来：生化学工

業株式会社製：コンドロイチン硫酸Cとも呼ばれている）をウシ睾丸ヒアルロニダーゼ（シグマ社製）で限定消化後、反応液を10分間100℃で保ち、酵素を加熱失活させた。この反応液をSuperdex 30カラム（60×1.6cm：アマシャムバイオサイエンス株式会社製、クロマトグラフィー条件；移動相：0.2mol/L NH_4HCO_3 、流速：2ml/分）にかけ、溶出液を225nmの吸光度でモニターしながら2ml毎に分画し、10糖相当画分をプールした。画分をPD10カラム（アマシャムバイオサイエンス株式会社製）により脱塩後、常法に従ってカルバゾール硫酸法によりウロン酸定量を行い、凍結乾燥した。凍結乾燥物を1mMとなるように蒸留水に溶解し、偶数オリゴ糖サンプルとした（コンドロイチン由来の10糖を「CH10」、コンドロイチン硫酸由来の10糖を「CS10」と記載する）。

10nmol/Lの MnCl_2 、171 $\mu\text{mol/L}$ のATPナトリウム塩を含む50mmol/L MES緩衝液（pH6.5）に酵素吸着ゲル懸濁液10 μl 、被検物質（コンドロイチン（CHEL）、コンドロイチン硫酸（CSEL）、CH10又はCS10）を1nmol、 $[^3\text{H}]$ UDP-GalNAcを0.036nmol添加して全量を30 μl とした。酵素反応は37℃で1時間行い、その後反応液を100℃で1分間保って酵素を失活させて反応を停止させた。

各々の反応液を孔径0.22 μm のマイクロフィルター（ミリポア社製）で濾過した後、Superdex peptideカラム（30×1.0cm：アマシャムバイオサイエンス株式会社製、クロマトグラフィー条件；移動相：0.2mol/L NaCl、流速1.0ml/分）で分離し、溶出液を0.5mlの画分毎に分取して、シンチレーションカウンターで放射能を測定した（図1）。その結果、強いGalNAc転移活性がCHEL（17乃至18画分）、CH10（23画分）及びCS10（23画分）をGalNAc受容体基質とした場合に観察され、CSELに対してはGalNAc転移活性は観察されなかった（16画分）。CH10及びCS10から得られた反応生成物の23画分は11糖が溶出する分子量を示す画分だった。CH10から得られた11糖を「CH11(K3)」、CS10から得られた11糖を「CS11(K3)」と記載する。

CS11(K3)の21～25画分を回収してプールし、PD10カラムにより脱塩した。このようにして得られたサンプルを二等分して凍結乾燥した。二分した一方を30mMの酢酸ナトリウムを含む0.1mol/LのTrisHCl緩衝液（pH7.4）100 μl に溶解し（CS11(K3)A）、他方をコンドロイチナーゼACIIで消化した（100mUのコンドロイチナー

ゼACII（生化学工業株式会社製）を100 μ lのCS11(K3)画分に溶解し、37℃で10時間酵素消化し、加熱して酵素を失活させた：CS11(K3)B）。

CS11(K3)AとCS11(K3)Bとを孔径0.22 μ mのマイクロフィルター（ミリポア社製）で濾過した後、Superdex peptideカラム(30 \times 10mm：アマシャムバイオサイエ
5 ンス株式会社製、クロマトグラフィー条件；移動相：0.2mol/L NaCl、流速0.5ml
/分)で分離し、溶出液を0.5mlの画分毎に分取して、シンチレーションカウンターで放射能を測定したところ、CS11(K3)Bにおいて単糖画分に放射能ピークがシ
フトした（図2）。この結果から、K3はコンドロイチン硫酸由来の10糖の非還元
末端のGlcUAに対してGalNAcを β 1,4結合で転移し、11糖を調製することができる
10 ことが明かとなった。

（2）コンドロイチン／コンドロイチン硫酸偶数糖の調製

コンドロイチン（サメ軟骨由来コンドロイチン硫酸を化学的に脱硫酸化：生化学工業株式会社製）及びコンドロイチン硫酸（サメ軟骨由来：生化学工業株式会
社製：コンドロイチン硫酸Cとも呼ばれている）をウシ睾丸ヒアルロニダーゼ（
15 シグマ社製）で限定消化後、反応液を10分間100℃で保ち、酵素を加熱失活させ
た。この反応液を10,000 \times gで10分間遠心処理し、上清を回収して更にウシ肝臓
由来 β グルクロニダーゼ（シグマ社製）で消化した。酵素反応は反応液を10分間
100℃で保って停止させた。この反応液をSuperdex 30カラム（60 \times 1.6cm：アマ
20 シャムバイオサイエンス株式会社製、クロマトグラフィー条件；移動相：0.2mol
/L NH_4HCO_3 、流速：2ml/分）にかけ溶出液を225nmの吸光度でモニターしながら
、2ml毎に分画し、11糖相当画分をプールした。各画分をPD10カラム（アマシャ
ムバイオサイエンス株式会社製）により脱塩後、常法に従ってカルバゾール硫酸
法によりウロン酸定量を行い、凍結乾燥した。凍結乾燥物を1mmol/Lとなるよう
に蒸留水に溶解し、奇数オリゴ糖サンプルとした（コンドロイチン由来の11糖：
25 「CH11」、コンドロイチン硫酸由来の11糖：「CS11」）。

またコンドロイチン（サメ軟骨由来コンドロイチン硫酸を化学的に脱硫酸化：生化学工業株式会社製）及びコンドロイチン硫酸（サメ軟骨由来：生化学工業株式社製：コンドロイチン硫酸Cとも呼ばれている）をウシ肝臓由来 β グルクロニ
ダーゼ（シグマ社製）で消化してサンプルとした（各々「CHOL」及び「CSOL」と

記載する)。

10mmol/Lの MnCl_2 、50mmol/L 酢酸緩衝液 (pH5.6) に酵素吸着ゲル懸濁液 $10\mu\text{l}$ 、被検物質 (CHOL、CSOL、CH11又はCS11) を 1nmol 、 $[^4\text{C}]\text{UDP-GlcUA}$ を 0.432nmol 添加して全量を $30\mu\text{l}$ とした。酵素反応は 37°C で1時間行い、その後反応液を 100

5 $^\circ\text{C}$ で1分間保って酵素を失活させて反応を停止させた。

各々の反応液を孔径 $0.22\mu\text{m}$ のマイクロフィルター (ミリポア社製) で濾過した後、Superdex peptideカラム ($30\times 1.0\text{cm}$: アマシャムバイオサイエンス株式会社製、クロマトグラフィー条件; 移動相: 0.2mol/L NaCl 、流速 0.5ml/分) で分離し、溶出液を 0.5ml の画分毎に分取して、シンチレーションカウンターで放射能

10 を測定した (図3)。その結果、強いGlcUA転移活性がCHOL (17乃至18画分)、CH11 (23画分) 及びCS11 (23画分) をGlcUA受容体基質とした場合に観察され、CSOLに対してはGlcUA転移活性が観察されなかった (16画分)。CH11及びCS11から得られた反応生成物の22~23画分は12糖が溶出する分子量を示す画分だった。CH11から得られた12糖を「CH12(K3)」、CS11から得られた12糖を「CS12(K3)」と記載する。

CS12(K3)の21乃至25画分を回収してプールし、PD10カラムにより脱塩した。このようにして得られたサンプルを二等分して凍結乾燥した。二分した一方を 30mmol/L の酢酸ナトリウムを含む 0.1mol/L のTrisHCl緩衝液 (pH7.4) $100\mu\text{l}$ に溶解し (CS12(K3)A)、他方をコンドロイチナーゼACIIで消化した (100m ユニットのコンドロイチナーゼACII (生化学工業株式会社製) を $100\mu\text{l}$ のCS11(K3)画分に溶解し、 37°C で10時間酵素消化し、加熱して酵素を失活させた: CS12(K3)B)。

CS12(K3)AとCS12(K3)Bとを孔径 $0.22\mu\text{m}$ のマイクロフィルター (ミリポア社製) で濾過した後、Superdex peptideカラム ($30\times 1.0\text{cm}$: アマシャムバイオサイエンス株式会社製、クロマトグラフィー条件; 移動相: 0.2mol/L NaCl 、流速 0.5ml/分) で分離し、溶出液を 0.5ml の画分毎に分取して、シンチレーションカウンターで放射能を測定したところ、CS12(K3)Bにおいて二糖画分に放射能ピークがシフトした (図4)。この結果から、K3はコンドロイチン硫酸由来の11糖に対してGlcUAを $\beta 1,3$ 結合で転移し、12糖を調製することができることが明かとなった。

参考例 3

コンドロイチン硫酸合成酵素 (K11) の調製

(1) cDNAのクローニングと発現ベクターの構築

コンドロイチン硫酸グルクロン酸転移酵素 (CSGlcA-T) のアミノ酸配列 (GenBank accession No. AB037823がコードするアミノ酸配列) をクエリーとして、BLAST検索を行った。その結果、EST (GenBank accession No. NM_018590) が見つかった。しかし、この配列は不完全であったため、ゲノムデータベースから、GenScan (米国スタンフォード大学) によりORFを調べた。その結果、配列番号 3 記載の塩基配列 (コードされるアミノ酸配列は配列番号 4) を発見した。配列番号 3 記載の塩基配列からなる遺伝子は、少なくともヒト脳で発現していることをMarathon-Ready cDNA (クロンテック社製) を鋳型としたRT-PCR法によって確認した。この遺伝子の膜貫通領域を含む領域 (配列番号 4 のアミノ酸番号 1 乃至 96 からなる領域) を除く可溶性領域をクローニングするため、配列番号 13 及び配列番号 14 の 2 種のプライマーを用いて常法に従ってPCRを行った。使用した鋳型cDNAはMarathon-Ready cDNA human brain (クロンテック社製) を使用した。増幅された約2kbのバンドを常法に従ってEcoRIとBamHIで消化し、ほ乳類細胞用の発現ベクターpFLAG-CMV-1 (シグマ社製) のEcoRIとBamHI部位に常法に従って挿入してK11-FLAG-CMV1を得た。得られたベクターの塩基配列を確認したところ、配列番号 3 記載の塩基配列の塩基番号287乃至2328の塩基配列からなるDNA断片が挿入されていることを確認した。この塩基配列を有するDNAのゲノム上の位置を、MIMを使用して確認したところ、2q36.3に存在することが明かとなった。

(2) K11の調製

K11-FLAG-CMV1 15mgをTransFast (プロメガ社製) を用い、プロトコールに従って100 mm培養皿に70コンフルエントになるように培養したCOS7細胞に遺伝子を導入した。3日間培養した上清を回収し、0.22 μ mのフィルターで濾過後、その上清10mlにAnti-FLAG M2-Agarose Affinity Gel (シグマ社製) 100 μ lを加え、4℃で一晩、転倒混和した。反応後、ゲルを50mmol/L Tris-HCl、pH7.4 (20グリセロール) 3回洗浄後、27Gの注射針をつけたシリンジを用い余分な洗浄液を除いた。このゲルを50mmol/L pH7.4のTrisHCl緩衝液、(20グリセロール、10mmol/L フェニ

ルメチルスルホニルフルオリド、 $1\mu\text{g/ml}$ leupeptin、 $1\mu\text{g/ml}$ pepstatin) に50 (v/v) となるように懸濁し、これを遠心分離した後に上清を取り除いて酵素吸着ゲル懸濁液とした。

5 参考例 4

K11を用いたコンドロイチン骨格の伸長

(1)コンドロイチン/コンドロイチン硫酸奇数糖の調製

10nmol/Lの MnCl_2 、 $171\mu\text{mol/L}$ のATPナトリウム塩を含む50mmol/L MES緩衝液 (pH6.5) に酵素吸着ゲル懸濁液 $10\mu\text{l}$ 、被検物質 (CHEL、CSEL、CH10又はCS10) を1nmol、 $[^3\text{H}]$ UDP-GalNAcを0.036nmol添加して全量を $30\mu\text{l}$ とした。酵素反応は37℃で1時間行い、その後反応液を100℃で1分間保って酵素を失活させて反応を停止させた。

各々の反応液を孔径 $0.22\mu\text{m}$ のマイクロフィルター (ミリポア社製) で濾過した後、Superdex peptideカラム ($30\times 1.0\text{cm}$: アマシャムバイオサイエンス株式会社製、クロマトグラフィー条件; 移動相: 0.2mol/L NaCl、流速 0.5ml/分) で分離し、溶出液を 0.5ml の画分毎に分取して、シンチレーションカウンターで放射能を測定した (図5)。その結果、強いGalNAc転移活性がCHEL (18画分)、CH10 (23画分) 及びCS10 (23画分) をGalNAc受容体基質とした場合に観察され、CSELに対しては弱いGalNAc転移活性が観察された (16画分)。CH10及びCS10から得られた反応生成物の22~23画分は11糖が溶出する分子量を示す画分だった。CH10から得られた11糖を「CH11 (K11)」、CS10から得られた11糖を「CS11 (K11)」と記載する。

CS11 (K11) の21~25画分を回収してプールし、PD10カラムにより脱塩した。このようにして得られたサンプルを二等分して凍結乾燥した。二分した一方を30mMの酢酸ナトリウムを含む 0.1mol/L のTrisHCl緩衝液 (pH7.4) $100\mu\text{l}$ に溶解し (CS11 (K11)A)、他方をコンドロイチナーゼACIIで消化した (100m ユニットのコンドロイチナーゼACII (生化学工業株式会社製) を $100\mu\text{l}$ のCS11画分に溶解し、37℃で10時間酵素消化し、加熱して酵素を失活させた: CS11 (K11)B)。

CS11 (K11)AとCS11 (K11)Bとを孔径 $0.22\mu\text{m}$ のマイクロフィルター (ミリポア社

製)で濾過した後、Superdex peptideカラム(30×10mm:アマシャムバイオサイエンス株式会社製、クロマトグラフィー条件;移動相:0.2mol/L NaCl、流速0.5 ml/分)で分離し、溶出液を0.5mlの画分毎に分取して、シンチレーションカウンターで放射能を測定したところ、CS11(K11)Bにおいて三糖画分に放射能ピークがシフトした(図6)。この結果から、K11はコンドロイチン硫酸由来の10糖の非還元末端のGlcUAに対してGalNAcを β 1,4結合で転移し、11糖を調製することができることが推測された。

(2)コンドロイチン/コンドロイチン硫酸偶数糖の調製

10nmol/Lの MnCl_2 、50mmol/L 酢酸緩衝液(pH5.6)に酵素吸着ゲル懸濁液10 μ l、被検物質(CHOL、CSOL、CH11又はCS11)を1nmol、 $[^{14}\text{C}]$ UDP-GlcUAを0.432nmol添加して全量を30 μ lとした。酵素反応は37℃で1時間行い、その後反応液を100℃で1分間保って酵素を失活させて反応を停止させた。

各々の反応液を孔径0.22 μ mのマイクロフィルター(ミリポア社製)で濾過した後、Superdex peptideカラム(30×1.0cm:アマシャムバイオサイエンス株式会社製、クロマトグラフィー条件;移動相:0.2mol/L NaCl、流速0.5ml/分)で分離し、溶出液を0.5mlの画分毎に分取して、シンチレーションカウンターで放射能を測定した(図3)。その結果、強いGlcUA転移活性がCHOL(18画分)、CH11(23画分)及びCS11(22画分)をGlcUA受容体基質とした場合に観察され、CSOLに対してはGlcUA転移活性が観察されなかった。CH11及びCS11から得られた反応生成物の22乃至23画分は12糖が溶出する分子量を示す画分だった。CH11から得られた12糖を「CH12(K11)」、CS11から得られた12糖を「CS12(K11)」と記載する。

CS12(K11)の21乃至25画分を回収してプールし、PD10カラムにより脱塩した。このようにして得られたサンプルを二等分して凍結乾燥した。二分した一方を30mmol/Lの酢酸ナトリウムを含む0.1mol/LのTrisHCl緩衝液(pH7.4)100 μ lに溶解し(CS12(K11)A)、他方をコンドロイチナーゼACIIで消化した(100mユニットのコンドロイチナーゼACII(生化学工業株式会社製)を100 μ lのCS11(K11)画分に溶解し、37℃で10時間酵素消化し、加熱して酵素を失活させた:CS12(K11)B)。

CS12(K11)AとCS12(K11)Bとを孔径0.22 μ mのマイクロフィルター(ミリポア社製)で濾過した後、Superdex peptideカラム(30×1.0cm:アマシャムバイオサイ

エンス株式会社製、クロマトグラフィー条件；移動相：0.2mol/L NaCl、流速0.5 ml/分)で分離し、溶出液を0.5mlの画分毎に分取して、シンチレーションカウンターで放射能を測定したところ、CS12(K11)Bにおいて二糖画分に放射能ピークがシフトした(図4)。この結果から、本発明酵素はコンドロイチン硫酸由来の11
5 糖に対してGlcUAを β 1,3結合で転移し、12糖を調製することができることが明らかとなった。

参考例 5

コンドロイチン硫酸合成酵素(β 4Gal-T7)の調製と活性の確認

10 Almeidaらの方法(J. Biol. Chem., 274, 37, 26165-26171(1999)のEXPERIMENTAL PROCEDURESの記載)に従って β 4Gal-T7のクローニングを行なった。得られたクローンの塩基配列を常法に従って確認したところ、配列番号5記載の塩基配列からなることが明かとなった。この塩基配列を有するDNAのゲノム上の位置を、O
MIMを使用して確認したところ、5q35に存在することが明かとなった。

15 更に、Gotohらの方法(J. Biol. Chem., 277, 41, 38189-38196(2002)に従って β 4Gal-T7の発現を行なって β 4Gal-T7が結合したアフィニティー担体の懸濁液を得た後、ゲル10 μ l、受容体基質(キシロース結合ペプチド(配列番号15:第9番目のアミノ酸残基であるセリンに側鎖としてキシロースが結合しているピクニンのN-末端配列):ペプチド研究所製)6.25mg、171 μ molのアデノシン三リン
20 酸(ATP)ナトリウム塩、0.036molの $[^3\text{H}]$ UDP-Galを10nmol/Lの MnCl_2 を含む50mmolのMES緩衝液(pH6.5)に加えて全量を30 μ lとし、37℃で1時間反応を行なった。その後反応液を100℃で1分間保って酵素を失活させて反応を停止させた。

反応液を孔径0.22 μ mのマイクロフィルター(ミリポア社製)で濾過した後、Superdex peptideカラム(30 \times 1.0cm:アマシャム バイオサイエンス株式会社製
25 、クロマトグラフィー条件；移動相：0.2mol/L NaCl、流速1.0ml/分)で分離し、溶出液を0.5mlの画分毎に分取して、シンチレーションカウンターで放射能を測定した。その結果、 $[^3\text{H}]$ UDP-Galの溶出画分とは別の高分子の画分に強い放射能が観察された。このことから、 β 4Gal-T7が受容体基質にガラクトースを結合させていることが裏付けられた。

実施例 1 血液サンプルからのDNA抽出と塩基配列解析

1mlの血液からGFX Genomic Blood DNA Purification Kit (アマシャム バイオサイエンス社製) を用いてDNAを抽出した。得られる14~16 μ gのDNAのうち、250
 5 ngを鋳型として、各種プライマー (下記表1 参照) によりコンドロイチン硫酸合成酵素 (K3、K11、 β 4Gal-T7) 遺伝子のエクソンを増幅した。このようにして得られる断片を鋳型にして、常法により塩基配列を解析し、それを健常な各コンドロイチン合成酵素の遺伝子の塩基配列を対比することで、変異や一塩基多型の有無を容易に調べることができる。

10

表 1

	エクソン増幅用		塩基配列解析用
	5' プライマー	3' プライマー	
K3 (Exon1)	配列番号 1 6	配列番号 1 7	配列番号 1 6、配列番号 1 7、配列番号 1 8、配列番号 1 9
K3 (Exon2)	配列番号 2 0	配列番号 2 1	配列番号 2 0、配列番号 2 1
K3 (Exon3)	配列番号 2 2	配列番号 2 3	配列番号 2 2、配列番号 2 3、配列番号 2 4、配列番号 2 5、配列番号 2 6、配列番号 2 7、配列番号 2 8、配列番号 2 9、配列番号 3 0、配列番号 3 1
K11 (Exon1)	配列番号 3 2	配列番号 3 3	配列番号 3 2、配列番号 3 3
K11 (Exon2)	配列番号 3 4	配列番号 3 5	配列番号 3 4、配列番号 3 5
K11 (Exon3)	配列番号 3 6	配列番号 3 7	配列番号 3 6、配列番号 3 7
K11 (Exon4)	配列番号 3 8	配列番号 3 9	配列番号 3 8、配列番号 3 9、配列番号 4 0、配列番号 4 1、配列番号 4 2、配列番号 4 3
β 4Gal-T7 (Exon1)	配列番号 4 4	配列番号 4 5	配列番号 4 4、配列番号 4 5
β 4Gal-T7 (Exon2)	配列番号 4 6	配列番号 4 7	配列番号 4 6、配列番号 4 7
β 4Gal-T7 (Exon3)	配列番号 4 8	配列番号 4 9	配列番号 4 8、配列番号 4 9
β 4Gal-T7 (Exon4)	配列番号 5 0	配列番号 5 1	配列番号 5 0、配列番号 5 1
β 4Gal-T7 (Exon5)	配列番号 5 2	配列番号 5 3	配列番号 5 2、配列番号 5 3
β 4Gal-T7 (Exon6)	配列番号 5 4	配列番号 5 5	配列番号 5 4、配列番号 5 5

実施例 2 血液サンプルからのRNA抽出と発現量解析

10mlの血液を3,000rpmで10分間遠心分離し、中間層を分取する。さらに、Lympho Prep (Nycomed社) を用いて遠心分離し中間層を分取する。この操作により末梢血中の単核球 (PBMC) 9×10^7 細胞を得る。全量のPBMCからRNA Extraction Kit

(アマシャム バイオサイエンス社製) を用いて総RNAを調製することができる。総RNA 10ngからSUPERScript First-Strand Synthesis System for RT-PCR (インビトロジェン社製) により1st strand cDNAを合成した。このcDNAを鋳型にして、real-time PCR法により各遺伝子の発現量を定量することができる。使用する

5 プライマー及びプローブを表2に示す。

表2

	5' プライマー	3' プライマー	プローブ
K3	配列番号56	配列番号57	配列番号58
K11	配列番号59	配列番号60	配列番号61
β 4Gal-T7	配列番号62	配列番号63	配列番号64

10 実施例3 病態モデルマウスの調製

ノックアウトマウスはマウスのK3 (mK3: 配列番号65)、K11 (mK11: 配列番号67) あるいは β 4Gal-T7 (m β 4Gal-T7: 配列番号69) の活性化ドメインを含むexon (mK3の場合にはORF部分の3番目のexon (1560bp) を含む約10kb断片、mK11の場合にはORF全長に相当する4598bpを含む約10 kb断片、m β 4Gal-T7の場合

15 にはORFの2から6番目のexonを含む約10 kb断片) を中心とした染色体断片 (約10 kb) を挿入した直鎖状ターゲティングベクター80 μ gをES細胞 (E14 / 129Sv マウス由来) にトランスフェクション (エレクトロポレーション) し、G418耐性のコロニーを選択した。G418耐性コロニーを24ウェルプレートに移し、培養を行った。細胞の一部を凍結保存した後、残りのES細胞からDNAを抽出し、PCRにより

20 組み換えが起こっているクローンを120コロニー程度選択した。さらに、サザンブロットングにより組換が予定通り起こっていることを確認し、最終的に組換体を10クローン程度選択した。選択したうちの2クローンのES細胞をC57BL/6マウスの胚盤胞内に注入した。ES細胞を注入したマウス胚を仮親マウスの子宮内へ移植してキメラマウスを誕生させた。その後、ジャームトランスミッションにより

25 りヘテロノックアウトマウスを得た。

参考文献

1. J. Bone Miner Res., 11(1996), pp.1602-1607
2. Endocr. Metab. Clin. North. Am., 24(1995), pp.437-450
3. Am. J. Hum. Genet., 69(2001), pp.1055-1061

5 産業上の利用の可能性

本発明により、骨パジェット病の新たな検出方法、及び骨パジェット病の病態動物が提供される。

請求の範囲

1. コンドロイチン合成酵素遺伝子の変異又は発現量と、骨パジェット病とを関連づけることを特徴とする骨パジェット病の検出方法。

5 2. 「コンドロイチン合成酵素」が、コンドロイチンの非還元末端の糖残基に対してD-グルクロン酸残基又はN-アセチル-D-ガラクトサミン残基を転移する活性を有する糖転移酵素であることを特徴とする請求項1記載の骨パジェット病の検出方法。

10 3. 「コンドロイチン合成酵素」が、「『アミノ酸残基に結合したキシロース残基』にD-ガラクトースを β 1,4グリコシド結合で転移する糖転移酵素」であることを特徴とする請求項1又は2記載の骨パジェット病の検出方法。

15 4. 「コンドロイチン合成酵素遺伝子」が配列番号1、配列番号3、配列番号5、配列番号65、配列番号67、又は配列番号69の何れかに記載の塩基配列からなる遺伝子であることを特徴とする請求項1記載の骨パジェット病の検出方法。

5. 配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号66、配列番号68、又は配列番号70の何れかに記載されたアミノ酸配列又はそれらに相同性を有するアミノ酸配列からなる糖転移酵素の遺伝子の発現が、一部又は完全に抑制されていることを特徴とするノックアウト動物。

図 1

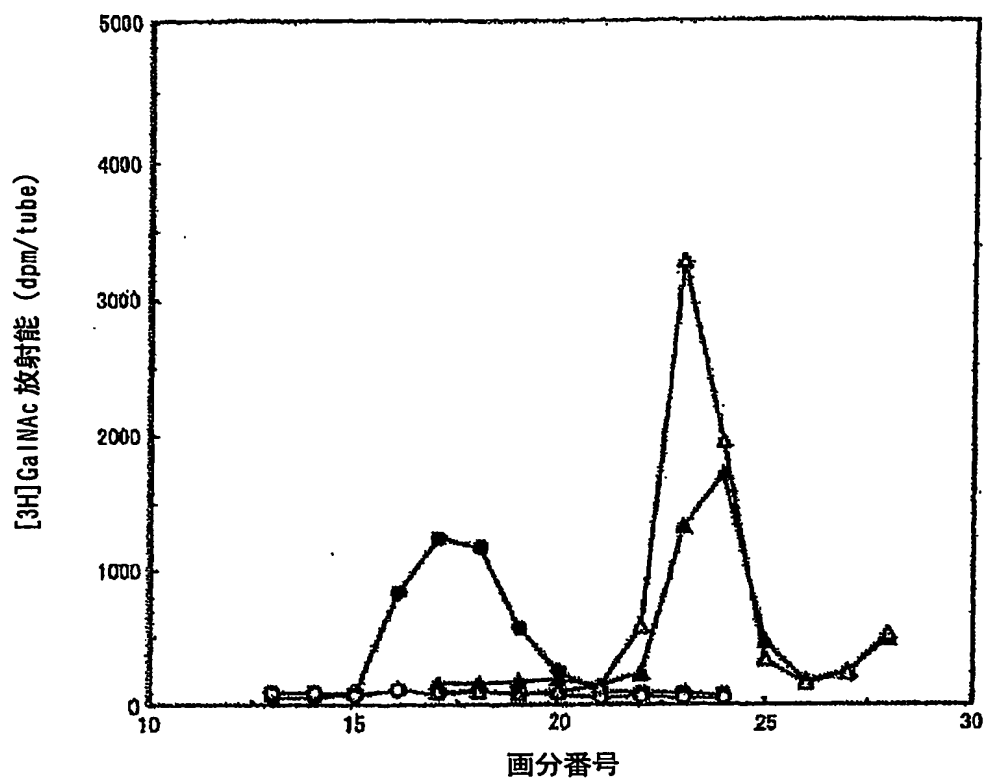


図 2

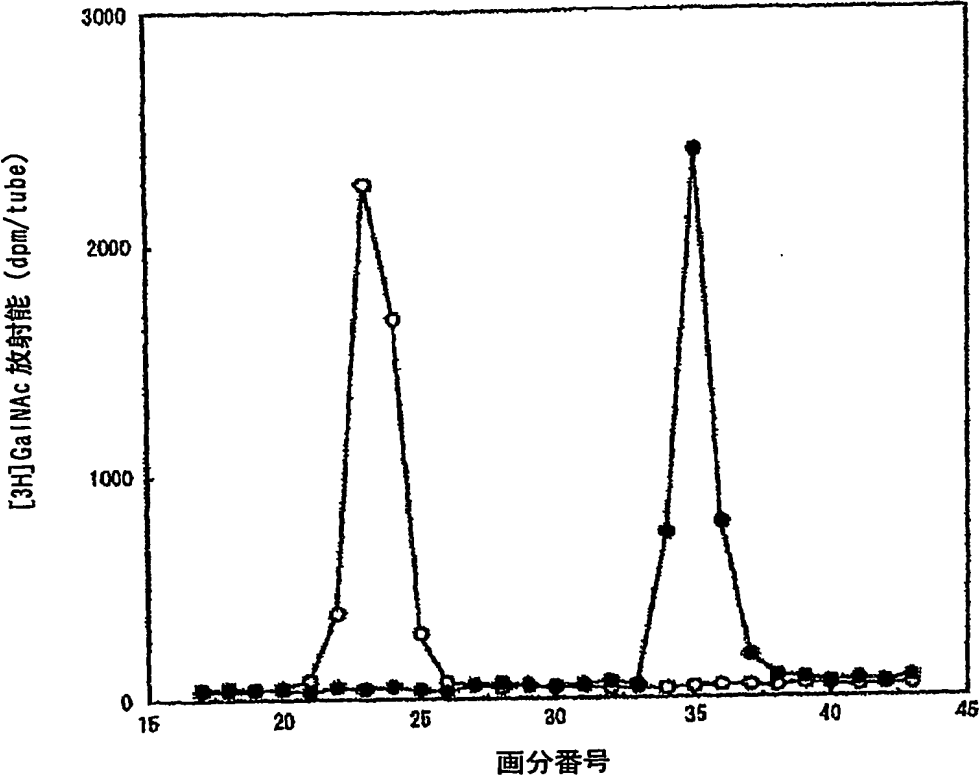


図 3

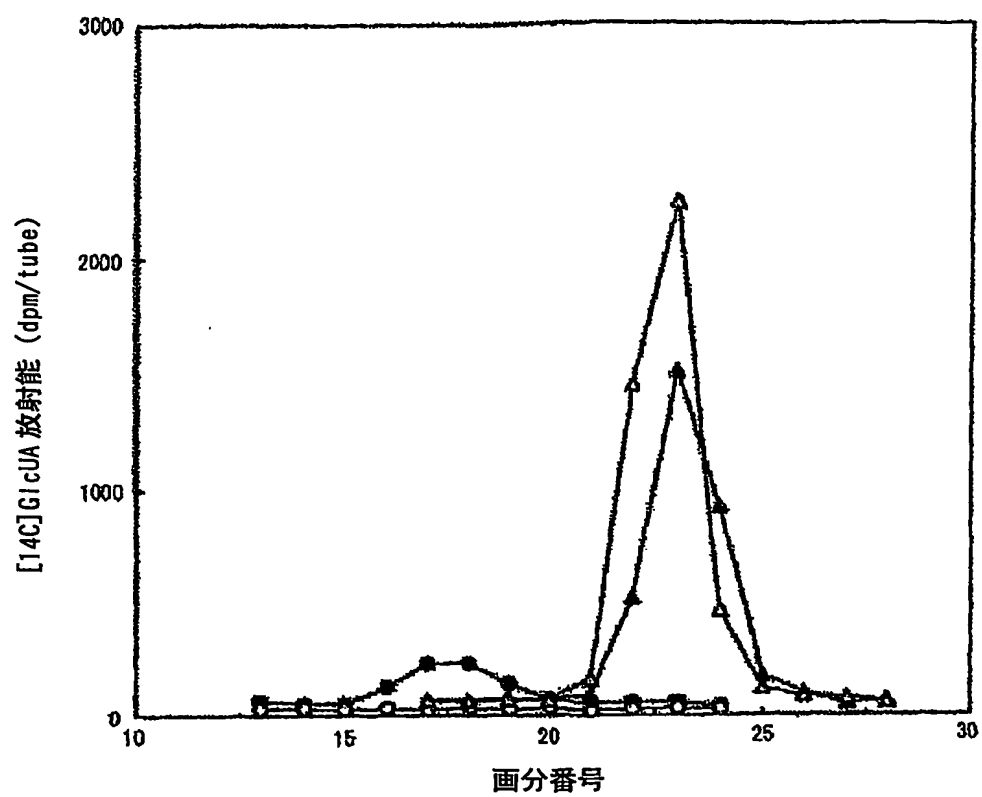


図 4

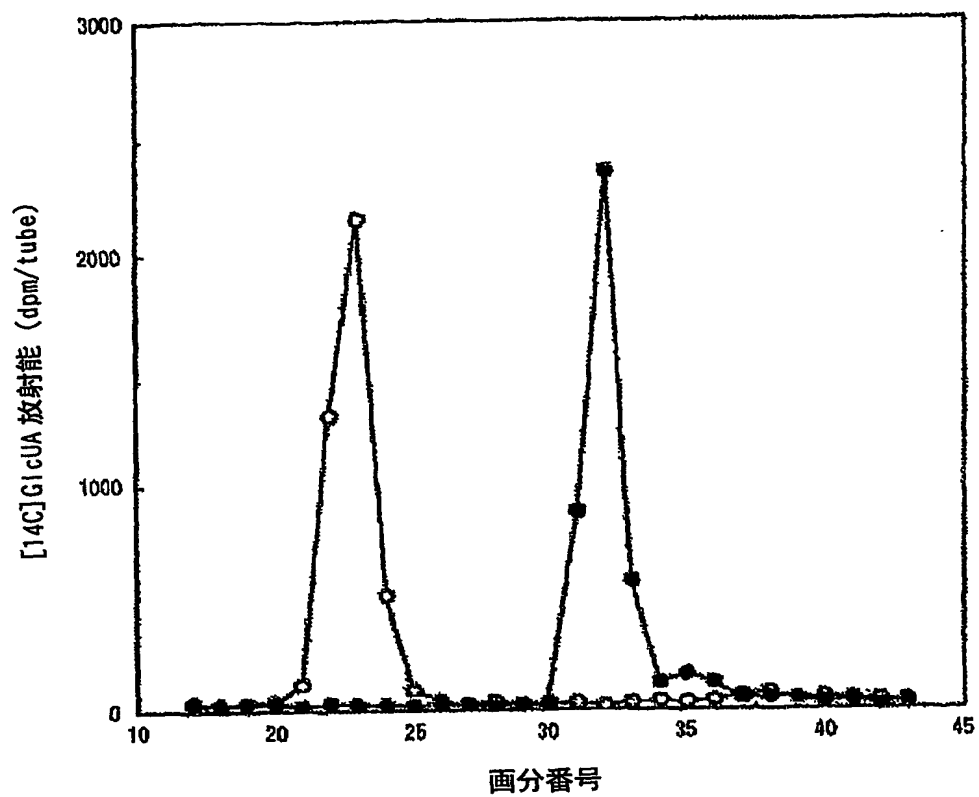


図 5

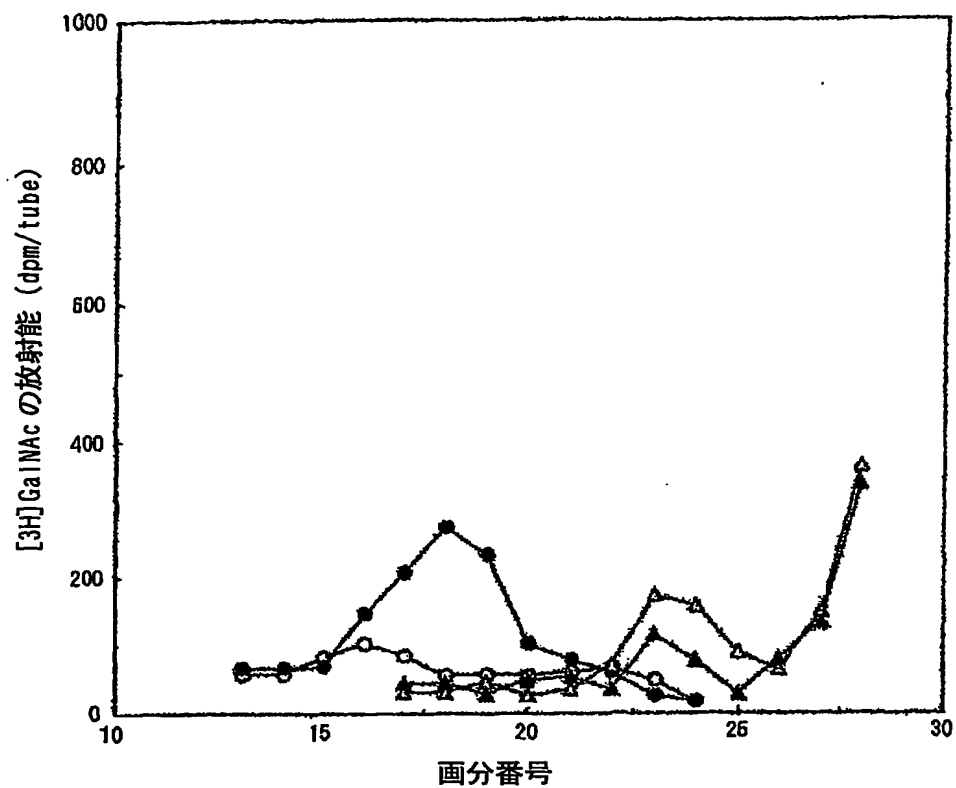


図 6

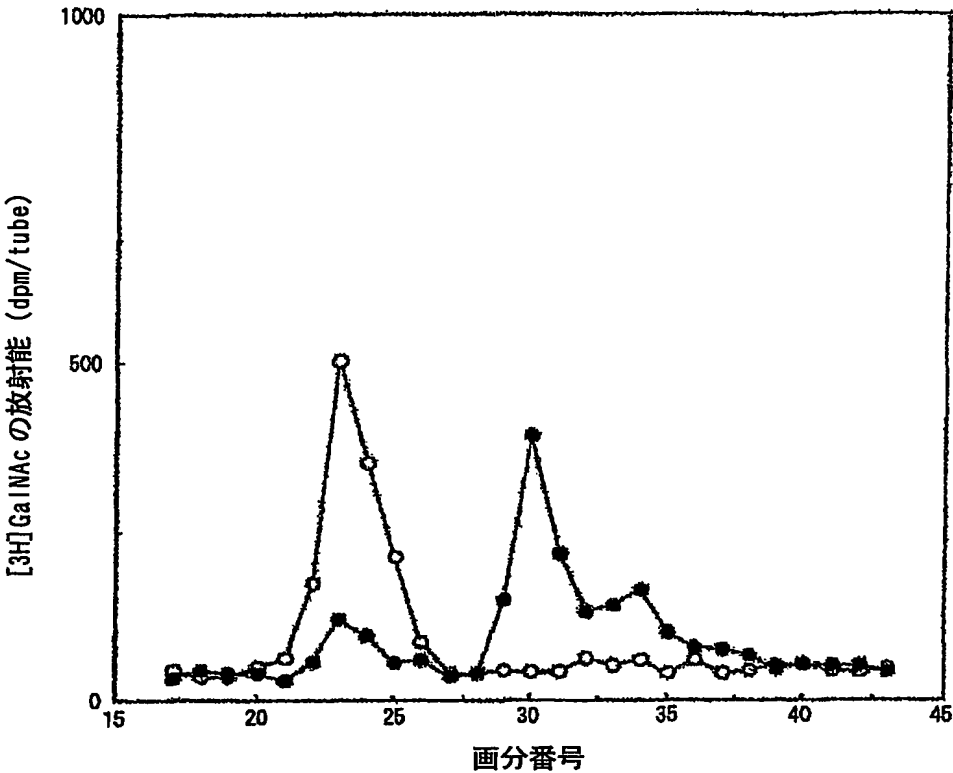


図 7

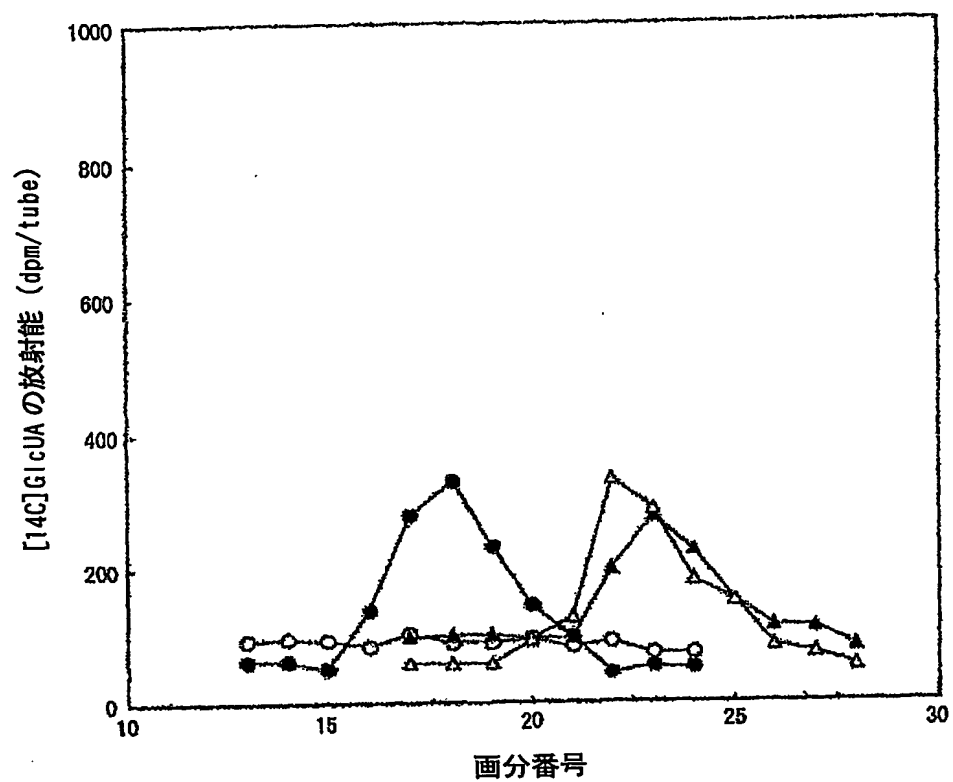
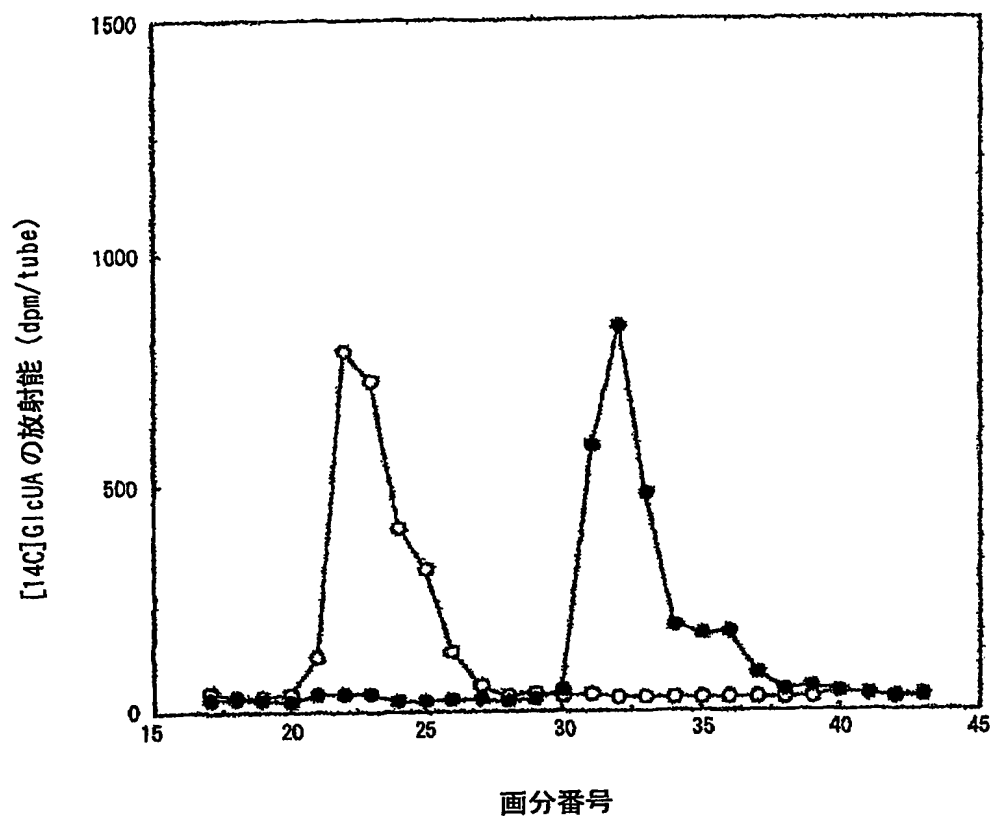


図 8



SEQUENCE LISTING

<110> NATIONAL INSTITUTE OF ADVANCED INDUSTRIAL SCIENCE AND TECHNOLOGY
AMERSHAM BIOSCIENCES K.K.

<120> A METHOD FOR DETECTING PAGET'S DISEASE OF BONE

<130> YCT-882

<150> JP2002-323438

<151> 2002-11-07

<160> 70

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 2649

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(2649)

<223>

<400> 1

atg gct gtg cgc tct cgc cgc ccg tgg atg agc gtg gca tta ggg ctg	48
Met Ala Val Arg Ser Arg Arg Pro Trp Met Ser Val Ala Leu Gly Leu	
1 5 10 15	
gtg ctg ggc ttc acc gcc gcg tcc tgg ctc atc gcc ccc agg gtg gcg	96
Val Leu Gly Phe Thr Ala Ala Ser Trp Leu Ile Ala Pro Arg Val Ala	
20 25 30	
gag ctg agc gag agg aag aga cgt ggc tcc agc ctc tgc tcc tac tac	144
Glu Leu Ser Glu Arg Lys Arg Arg Gly Ser Ser Leu Cys Ser Tyr Tyr	
35 40 45	
ggt cgc tct gct gct ggc ccc cgc gcc ggc gct cag cag ccg ctc ccc	192

245	250	255	
ttc atg cgc gcc gac gac gat gtc tac atc aaa ggt gat aaa tta gaa			816
Phe Met Arg Ala Asp Asp Asp Val Tyr Ile Lys Gly Asp Lys Leu Glu			
260	265	270	
gag ttt ctt aga tcg cta aac agc agt aag cct ctc tac ctg gga cag			864
Glu Phe Leu Arg Ser Leu Asn Ser Ser Lys Pro Leu Tyr Leu Gly Gln			
275	280	285	
act ggc ctg ggg aat att gaa gag ctt gga aag ctg gga ctg gag cct			912
Thr Gly Leu Gly Asn Ile Glu Glu Leu Gly Lys Leu Gly Leu Glu Pro			
290	295	300	
ggg gaa aac ttc tgt atg gga gga cct ggc atg atc ttt agc cga gaa			960
Gly Glu Asn Phe Cys Met Gly Gly Pro Gly Met Ile Phe Ser Arg Glu			
305	310	315	320
gtt ctc agg agg atg gtg cca cat att ggt gaa tgc ctt aga gaa atg			1008
Val Leu Arg Arg Met Val Pro His Ile Gly Glu Cys Leu Arg Glu Met			
325	330	335	
tac acg act cat gag gat gtg gaa gta gga aga tgc gtt cgc cgt ttt			1056
Tyr Thr Thr His Glu Asp Val Glu Val Gly Arg Cys Val Arg Arg Phe			
340	345	350	
ggt ggg act cag tgt gtc tgg tct tac gag atg caa caa ctg ttc cat			1104
Gly Gly Thr Gln Cys Val Trp Ser Tyr Glu Met Gln Gln Leu Phe His			
355	360	365	
gaa aat tat gaa cac aat cgg aag ggt tac atc caa gac ctt cac aat			1152
Glu Asn Tyr Glu His Asn Arg Lys Gly Tyr Ile Gln Asp Leu His Asn			
370	375	380	
agc aaa atc cat gca gcc ata aca ctt cat ccc aac aaa agg cct gca			1200
Ser Lys Ile His Ala Ala Ile Thr Leu His Pro Asn Lys Arg Pro Ala			
385	390	395	400
tac caa tac agg ctg cat aat tac atg ctc agc cgc aaa att tct gaa			1248
Tyr Gln Tyr Arg Leu His Asn Tyr Met Leu Ser Arg Lys Ile Ser Glu			
405	410	415	
ctt cgc tac cgc acc atc cag ctc cac agg gaa agt gcc ctg atg agc			1296
Leu Arg Tyr Arg Thr Ile Gln Leu His Arg Glu Ser Ala Leu Met Ser			
420	425	430	
aag ctc agt aac aca gaa gtg agc aaa gag gac cag cag ctg gga gtg			1344
Lys Leu Ser Asn Thr Glu Val Ser Lys Glu Asp Gln Gln Leu Gly Val			
435	440	445	

ata cct tct ttc aac cac ttc cag cct cgg gag aga aat gaa gtg ata	1392
Ile Pro Ser Phe Asn His Phe Gln Pro Arg Glu Arg Asn Glu Val Ile	
450 455 460	
gaa tgg gag ttc ctg aca ggg aag ctt cta tac tca gca gct gag aac	1440
Glu Trp Glu Phe Leu Thr Gly Lys Leu Leu Tyr Ser Ala Ala Glu Asn	
465 470 475 480	
cag ccc cct cga cag agc ctc agt agc att tta aga aca gca ctg gat	1488
Gln Pro Pro Arg Gln Ser Leu Ser Ser Ile Leu Arg Thr Ala Leu Asp	
485 490 495	
gat acc gtc cta cag gtg atg gag atg atc aat gag aat gcc aag agc	1536
Asp Thr Val Leu Gln Val Met Glu Met Ile Asn Glu Asn Ala Lys Ser	
500 505 510	
aga gga cgg ctc att gac ttc aag gaa att cag tat ggc tac cgc aga	1584
Arg Gly Arg Leu Ile Asp Phe Lys Glu Ile Gln Tyr Gly Tyr Arg Arg	
515 520 525	
gtt aac ccc atg cac ggg gtg gag tac att ttg gat tta ctc ctt tta	1632
Val Asn Pro Met His Gly Val Glu Tyr Ile Leu Asp Leu Leu Leu Leu	
530 535 540	
tac aaa aga cac aag gga agg aaa ctg act gtg cca gtg aga cgt cat	1680
Tyr Lys Arg His Lys Gly Arg Lys Leu Thr Val Pro Val Arg Arg His	
545 550 555 560	
gcc tat ctt cag cag ttg ttc agc aag cct ttc ttc aga gag acc gaa	1728
Ala Tyr Leu Gln Gln Leu Phe Ser Lys Pro Phe Phe Arg Glu Thr Glu	
565 570 575	
gag cta gat gtc aac agt ctt gtg gag agt att aac agt gaa act cag	1776
Glu Leu Asp Val Asn Ser Leu Val Glu Ser Ile Asn Ser Glu Thr Gln	
580 585 590	
tca ttc tcc ttt ata tct aat tct tta aag ata tta tct tct ttt caa	1824
Ser Phe Ser Phe Ile Ser Asn Ser Leu Lys Ile Leu Ser Ser Phe Gln	
595 600 605	
ggt gcc aaa gaa atg gga ggg cac aat gaa aag aaa gta cac att ctc	1872
Gly Ala Lys Glu Met Gly Gly His Asn Glu Lys Lys Val His Ile Leu	
610 615 620	
gtt cct ctc atc gga agg tat gac att ttc ttg aga ttc atg gag aac	1920
Val Pro Leu Ile Gly Arg Tyr Asp Ile Phe Leu Arg Phe Met Glu Asn	
625 630 635 640	
ttt gaa aac atg tgt ctt atc cca aag cag aat gta aag ttg gtc att	1968

Phe Glu Asn Met Cys Leu Ile Pro Lys Gln Asn Val Lys Leu Val Ile	
645 650 655	
atc ctt ttc agt agg gat tct ggc caa gac tcc agc aag cat att gag	2016
Ile Leu Phe Ser Arg Asp Ser Gly Gln Asp Ser Ser Lys His Ile Glu	
660 665 670	
ctg ata aaa ggg tac cag aac aag tac ccc aaa gca gaa atg acc ctg	2064
Leu Ile Lys Gly Tyr Gln Asn Lys Tyr Pro Lys Ala Glu Met Thr Leu	
675 680 685	
atc cca atg aag gga gag ttt tcc aga ggt ctt ggt ctt gaa atg gct	2112
Ile Pro Met Lys Gly Glu Phe Ser Arg Gly Leu Gly Leu Glu Met Ala	
690 695 700	
tct gcc cag ttt gac aat gac act ttg ctg cta ttt tgt gat gtt gac	2160
Ser Ala Gln Phe Asp Asn Asp Thr Leu Leu Leu Phe Cys Asp Val Asp	
705 710 715 720	
ttg atc ttc aga gaa gat ttt ctc caa cga tgt aga gac aat aca att	2208
Leu Ile Phe Arg Glu Asp Phe Leu Gln Arg Cys Arg Asp Asn Thr Ile	
725 730 735	
cag gga caa cag gtg tac tat ccc atc atc ttt agc cag tat gac cca	2256
Gln Gly Gln Gln Val Tyr Tyr Pro Ile Ile Phe Ser Gln Tyr Asp Pro	
740 745 750	
aag gta aca aac ggg gga aat cct ccc act gat ggt tac ttc ata ttc	2304
Lys Val Thr Asn Gly Gly Asn Pro Pro Thr Asp Gly Tyr Phe Ile Phe	
755 760 765	
tca aaa aag act gga ttt tgg aga gac tat gga tat ggc atc acc tgt	2352
Ser Lys Lys Thr Gly Phe Trp Arg Asp Tyr Gly Tyr Gly Ile Thr Cys	
770 775 780	
att tac aaa agt gat ctt cta ggt gca ggt gga ttt gat acc tca ata	2400
Ile Tyr Lys Ser Asp Leu Leu Gly Ala Gly Gly Phe Asp Thr Ser Ile	
785 790 795 800	
caa ggc tgg gga cta gaa gat gta gat ctc tac aat aaa gtc att cta	2448
Gln Gly Trp Gly Leu Glu Asp Val Asp Leu Tyr Asn Lys Val Ile Leu	
805 810 815	
tct ggc tta agg cca ttc aga agc caa gaa gta gga gtg gtg cat att	2496
Ser Gly Leu Arg Pro Phe Arg Ser Gln Glu Val Gly Val Val His Ile	
820 825 830	
ttc cat cca gtt cat tgt gat cct aac ttg gac cct aag cag tat aag	2544
Phe His Pro Val His Cys Asp Pro Asn Leu Asp Pro Lys Gln Tyr Lys	

835	840	845	
atg tgc tta gga tcc aag gca agt act ttc gcc tca acc atg caa ctg			2592
Met Cys Leu Gly Ser Lys Ala Ser Thr Phe Ala Ser Thr Met Gln Leu			
850	855	860	
gct gaa ctc tgg ctt gaa aaa cat tta ggt gtc agg tac aat cga act			2640
Ala Glu Leu Trp Leu Glu Lys His Leu Gly Val Arg Tyr Asn Arg Thr			
865	870	875	880
ctc tcc tga			2649
Leu Ser			

<210> 2

<211> 882

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met	Ala	Val	Arg	Ser	Arg	Arg	Pro	Trp	Met	Ser	Val	Ala	Leu	Gly	Leu
1				5					10					15	

Val	Leu	Gly	Phe	Thr	Ala	Ala	Ser	Trp	Leu	Ile	Ala	Pro	Arg	Val	Ala
			20					25					30		

Glu	Leu	Ser	Glu	Arg	Lys	Arg	Arg	Gly	Ser	Ser	Leu	Cys	Ser	Tyr	Tyr
		35					40					45			

Gly	Arg	Ser	Ala	Ala	Gly	Pro	Arg	Ala	Gly	Ala	Gln	Gln	Pro	Leu	Pro
		50				55					60				

Gln	Pro	Gln	Ser	Arg	Pro	Arg	Gln	Glu	Gln	Ser	Pro	Pro	Pro	Ala	Arg
65					70					75				80	

Gln Asp Leu Gln Gly Pro Pro Leu Pro Glu Ala Ala Pro Gly Ile Thr
85 90 95

Ser Phe Arg Ser Ser Pro Trp Gln Gln Pro Pro Pro Leu Gln Gln Arg
100 105 110

Arg Arg Gly Arg Glu Pro Glu Gly Ala Thr Gly Leu Pro Gly Ala Pro
115 120 125

Ala Ala Glu Gly Glu Pro Glu Glu Glu Asp Gly Gly Ala Ala Gly Gln
130 135 140

Arg Arg Asp Gly Arg Pro Gly Ser Ser His Asn Gly Ser Gly Asp Gly
145 150 155 160

Gly Ala Ala Ala Pro Ser Ala Arg Pro Arg Asp Phe Leu Tyr Val Gly
165 170 175

Val Met Thr Ala Gln Lys Tyr Leu Gly Ser Arg Ala Leu Ala Ala Gln
180 185 190

Arg Thr Trp Ala Arg Phe Ile Pro Gly Arg Val Glu Phe Phe Ser Ser
195 200 205

Gln Gln Pro Pro Asn Ala Gly Gln Pro Pro Pro Pro Leu Pro Val Ile
210 215 220

Ala Leu Pro Gly Val Asp Asp Ser Tyr Pro Pro Gln Lys Lys Ser Phe

225	230	235	240
Met Met Ile Lys Tyr Met His Asp His Tyr Leu Asp Lys Tyr Glu Trp			
245	250	255	
Phe Met Arg Ala Asp Asp Asp Val Tyr Ile Lys Gly Asp Lys Leu Glu			
260	265	270	
Glu Phe Leu Arg Ser Leu Asn Ser Ser Lys Pro Leu Tyr Leu Gly Gln			
275	280	285	
Thr Gly Leu Gly Asn Ile Glu Glu Leu Gly Lys Leu Gly Leu Glu Pro			
290	295	300	
Gly Glu Asn Phe Cys Met Gly Gly Pro Gly Met Ile Phe Ser Arg Glu			
305	310	315	320
Val Leu Arg Arg Met Val Pro His Ile Gly Glu Cys Leu Arg Glu Met			
325	330	335	
Tyr Thr Thr His Glu Asp Val Glu Val Gly Arg Cys Val Arg Arg Phe			
340	345	350	
Gly Gly Thr Gln Cys Val Trp Ser Tyr Glu Met Gln Gln Leu Phe His			
355	360	365	
Glu Asn Tyr Glu His Asn Arg Lys Gly Tyr Ile Gln Asp Leu His Asn			
370	375	380	

Ser Lys Ile His Ala Ala Ile Thr Leu His Pro Asn Lys Arg Pro Ala
385 390 395 400

Tyr Gln Tyr Arg Leu His Asn Tyr Met Leu Ser Arg Lys Ile Ser Glu
405 410 415

Leu Arg Tyr Arg Thr Ile Gln Leu His Arg Glu Ser Ala Leu Met Ser
420 425 430

Lys Leu Ser Asn Thr Glu Val Ser Lys Glu Asp Gln Gln Leu Gly Val
435 440 445

Ile Pro Ser Phe Asn His Phe Gln Pro Arg Glu Arg Asn Glu Val Ile
450 455 460

Glu Trp Glu Phe Leu Thr Gly Lys Leu Leu Tyr Ser Ala Ala Glu Asn
465 470 475 480

Gln Pro Pro Arg Gln Ser Leu Ser Ser Ile Leu Arg Thr Ala Leu Asp
485 490 495

Asp Thr Val Leu Gln Val Met Glu Met Ile Asn Glu Asn Ala Lys Ser
500 505 510

Arg Gly Arg Leu Ile Asp Phe Lys Glu Ile Gln Tyr Gly Tyr Arg Arg
515 520 525

Val Asn Pro Met His Gly Val Glu Tyr Ile Leu Asp Leu Leu Leu Leu
530 535 540

Tyr Lys Arg His Lys Gly Arg Lys Leu Thr Val Pro Val Arg Arg His
545 550 555 560

Ala Tyr Leu Gln Gln Leu Phe Ser Lys Pro Phe Phe Arg Glu Thr Glu
565 570 575

Glu Leu Asp Val Asn Ser Leu Val Glu Ser Ile Asn Ser Glu Thr Gln
580 585 590

Ser Phe Ser Phe Ile Ser Asn Ser Leu Lys Ile Leu Ser Ser Phe Gln
595 600 605

Gly Ala Lys Glu Met Gly Gly His Asn Glu Lys Lys Val His Ile Leu
610 615 620

Val Pro Leu Ile Gly Arg Tyr Asp Ile Phe Leu Arg Phe Met Glu Asn
625 630 635 640

Phe Glu Asn Met Cys Leu Ile Pro Lys Gln Asn Val Lys Leu Val Ile
645 650 655

Ile Leu Phe Ser Arg Asp Ser Gly Gln Asp Ser Ser Lys His Ile Glu
660 665 670

Leu Ile Lys Gly Tyr Gln Asn Lys Tyr Pro Lys Ala Glu Met Thr Leu
675 680 685

Ile Pro Met Lys Gly Glu Phe Ser Arg Gly Leu Gly Leu Glu Met Ala
690 695 700

Ser Ala Gln Phe Asp Asn Asp Thr Leu Leu Leu Phe Cys Asp Val Asp
705 710 715 720

Leu Ile Phe Arg Glu Asp Phe Leu Gln Arg Cys Arg Asp Asn Thr Ile
725 730 735

Gln Gly Gln Gln Val Tyr Tyr Pro Ile Ile Phe Ser Gln Tyr Asp Pro
740 745 750

Lys Val Thr Asn Gly Gly Asn Pro Pro Thr Asp Gly Tyr Phe Ile Phe
755 760 765

Ser Lys Lys Thr Gly Phe Trp Arg Asp Tyr Gly Tyr Gly Ile Thr Cys
770 775 780

Ile Tyr Lys Ser Asp Leu Leu Gly Ala Gly Gly Phe Asp Thr Ser Ile
785 790 795 800

Gln Gly Trp Gly Leu Glu Asp Val Asp Leu Tyr Asn Lys Val Ile Leu
805 810 815

Ser Gly Leu Arg Pro Phe Arg Ser Gln Glu Val Gly Val Val His Ile

820

825

830

Phe His Pro Val His Cys Asp Pro Asn Leu Asp Pro Lys Gln Tyr Lys
 835 840 845

Met Cys Leu Gly Ser Lys Ala Ser Thr Phe Ala Ser Thr Met Gln Leu
 850 855 860

Ala Glu Leu Trp Leu Glu Lys His Leu Gly Val Arg Tyr Asn Arg Thr
 865 870 875 880

Leu Ser

<210> 3
 <211> 2328
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (1).. (2328)
 <223>

<400> 3
 atg cgg gca tcg ctg ctg ctg tcg gtg ctg cgg ccc gca ggg ccc gtg 48
 Met Arg Ala Ser Leu Leu Leu Ser Val Leu Arg Pro Ala Gly Pro Val
 1 5 10 15
 gcc gtg ggc atc tcc ctg ggc ttc acc ctg agc ctg ctc agc gtc acc 96
 Ala Val Gly Ile Ser Leu Gly Phe Thr Leu Ser Leu Leu Ser Val Thr
 20 25 30
 tgg gtg gag gag ccg tgc ggc cca ggc cgg ccc caa cct gga gac tct 144

Trp Val Glu Glu Pro Cys Gly Pro Gly Pro Pro Gln Pro Gly Asp Ser	
35 40 45	
gag ctg ccg ccg cgc ggc aac acc aac gcg gcg cgc cgg ccc aac tcg	192
Glu Leu Pro Pro Arg Gly Asn Thr Asn Ala Ala Arg Arg Pro Asn Ser	
50 55 60	
gtg cag ccc gga gcg gag cgc gag aag ccc ggg gcc ggc gaa ggc gcc	240
Val Gln Pro Gly Ala Glu Arg Glu Lys Pro Gly Ala Gly Glu Gly Ala	
65 70 75 80	
ggg gag aat tgg gag ccg cgc gtc ttg ccc tac cac cct gca cag ccc	288
Gly Glu Asn Trp Glu Pro Arg Val Leu Pro Tyr His Pro Ala Gln Pro	
85 90 95	
ggc cag gcc gcc aaa aag gcc gtc agg acc cgc tac atc agc acg gag	336
Gly Gln Ala Ala Lys Lys Ala Val Arg Thr Arg Tyr Ile Ser Thr Glu	
100 105 110	
ctg ggc atc agg cag agg ctg ctg gtg gcg gtg ctg acc tct cag acc	384
Leu Gly Ile Arg Gln Arg Leu Leu Val Ala Val Leu Thr Ser Gln Thr	
115 120 125	
acg ctg ccc acg ctg ggc gtg gcc gtg aac cgc acg ctg ggg cac cgg	432
Thr Leu Pro Thr Leu Gly Val Ala Val Asn Arg Thr Leu Gly His Arg	
130 135 140	
ctg gag cgt gtg gtg ttc ctg acg ggc gca cgg ggc cgc cgg gcc cca	480
Leu Glu Arg Val Val Phe Leu Thr Gly Ala Arg Gly Arg Arg Ala Pro	
145 150 155 160	
cct ggc atg gca gtg gtg acg ctg ggc gag gag cga ccc att gga cac	528
Pro Gly Met Ala Val Val Thr Leu Gly Glu Glu Arg Pro Ile Gly His	
165 170 175	
ctg cac ctg gcg ctg cgc cac ctg ctg gag cag cac ggc gac gac ttt	576
Leu His Leu Ala Leu Arg His Leu Leu Glu Gln His Gly Asp Asp Phe	
180 185 190	
gac tgg ttc ttc ctg gtg cct gac acc acc tac acc gag gcg cac ggc	624
Asp Trp Phe Phe Leu Val Pro Asp Thr Thr Tyr Thr Glu Ala His Gly	
195 200 205	
ctg gca cgc cta act ggc cac ctc agc ctg gcc tcc gcc gcc cac ctg	672
Leu Ala Arg Leu Thr Gly His Leu Ser Leu Ala Ser Ala Ala His Leu	
210 215 220	
tac ctg ggc cgg ccc cag gac ttc atc ggc gga gag ccc acc ccc ggc	720
Tyr Leu Gly Arg Pro Gln Asp Phe Ile Gly Gly Glu Pro Thr Pro Gly	

225	230	235	240	
cgc tac tgc cac gga ggc ttt ggg gtg ctg ctg tcg cgc atg ctg ctg				768
Arg Tyr Cys His Gly Gly Phe Gly Val Leu Leu Ser Arg Met Leu Leu				
245	250	255		
caa caa ctg cgc ccc cac ctg gaa ggc tgc cgc aac gac atc gtc agt				816
Gln Gln Leu Arg Pro His Leu Glu Gly Cys Arg Asn Asp Ile Val Ser				
260	265	270		
gcg cgc cct gac gag tgg ctg ggt cgc tgc att ctc gat gcc acc ggg				864
Ala Arg Pro Asp Glu Trp Leu Gly Arg Cys Ile Leu Asp Ala Thr Gly				
275	280	285		
gtg ggc tgc act ggt gac cac gag ggg gtg cac tat agc cat ctg gag				912
Val Gly Cys Thr Gly Asp His Glu Gly Val His Tyr Ser His Leu Glu				
290	295	300		
ctg agc cct ggg gag cca gtg cag gag ggg gac cct cat ttc cga agt				960
Leu Ser Pro Gly Glu Pro Val Gln Glu Gly Asp Pro His Phe Arg Ser				
305	310	315	320	
gcc ctg aca gcc cac cct gtg cgt gac cct gtg cac atg tac cag ctg				1008
Ala Leu Thr Ala His Pro Val Arg Asp Pro Val His Met Tyr Gln Leu				
325	330	335		
cac aaa gct ttc gcc cga gct gaa ctg gaa cgc acg tac cag gag atc				1056
His Lys Ala Phe Ala Arg Ala Glu Leu Glu Arg Thr Tyr Gln Glu Ile				
340	345	350		
cag gag tta cag tgg gag atc cag aat acc agc cat ctg gcc gtt gat				1104
Gln Glu Leu Gln Trp Glu Ile Gln Asn Thr Ser His Leu Ala Val Asp				
355	360	365		
ggg gac cgg gca gct gct tgg ccc gtg ggt att cca gca cca tcc cgc				1152
Gly Asp Arg Ala Ala Ala Trp Pro Val Gly Ile Pro Ala Pro Ser Arg				
370	375	380		
ccg gcc tcc cgc ttt gag gtg ctg cgc tgg gac tac ttc acg gag cag				1200
Pro Ala Ser Arg Phe Glu Val Leu Arg Trp Asp Tyr Phe Thr Glu Gln				
385	390	395	400	
cac gct ttc tcc tgc gcc gat ggc tca ccc cgc tgc cca ctg cgt ggg				1248
His Ala Phe Ser Cys Ala Asp Gly Ser Pro Arg Cys Pro Leu Arg Gly				
405	410	415		
gct gac cgg gct gat gtg gcc gat gtt ctg ggg aca gct cta gag gag				1296
Ala Asp Arg Ala Asp Val Ala Asp Val Leu Gly Thr Ala Leu Glu Glu				
420	425	430		

ctg aac cgc cgc tac cac ccg gcc ttg cgg ctc cag aag cag cag ctg	1344
Leu Asn Arg Arg Tyr His Pro Ala Leu Arg Leu Gln Lys Gln Gln Leu	
435 440 445	
gtg aat ggc tac cga cgc ttt gat ccg gcc cgg ggt atg gaa tac acg	1392
Val Asn Gly Tyr Arg Arg Phe Asp Pro Ala Arg Gly Met Glu Tyr Thr	
450 455 460	
ctg gac ttg cag ctg gag gca ctg acc ccc cag gga ggc cgc cgg ccc	1440
Leu Asp Leu Gln Leu Glu Ala Leu Thr Pro Gln Gly Gly Arg Arg Pro	
465 470 475 480	
ctc act cgc cga gtg cag ctg ctc cgg ccg ctg agc cgc gtg gag atc	1488
Leu Thr Arg Arg Val Gln Leu Leu Arg Pro Leu Ser Arg Val Glu Ile	
485 490 495	
ttg cct gtg ccc tat gtc act gag gcc tca cgt ctc act gtg ctg ctg	1536
Leu Pro Val Pro Tyr Val Thr Glu Ala Ser Arg Leu Thr Val Leu Leu	
500 505 510	
ccg cta gct gcg gct gag cgt gac ctg gcc cct ggc ttc ttg gag gcc	1584
Pro Leu Ala Ala Ala Glu Arg Asp Leu Ala Pro Gly Phe Leu Glu Ala	
515 520 525	
ttt gcc act gca gca ctg gag cct ggt gat gct gcg gca gcc ctg acc	1632
Phe Ala Thr Ala Ala Leu Glu Pro Gly Asp Ala Ala Ala Ala Leu Thr	
530 535 540	
ctg ctg cta ctg tat gag ccg cgc cag gcc cag cgc gtg gcc cat gca	1680
Leu Leu Leu Leu Tyr Glu Pro Arg Gln Ala Gln Arg Val Ala His Ala	
545 550 555 560	
gat gtc ttc gca cct gtc aag gcc cac gtg gca gag ctg gag cgg cgt	1728
Asp Val Phe Ala Pro Val Lys Ala His Val Ala Glu Leu Glu Arg Arg	
565 570 575	
ttc ccc ggt gcc cgg gtg cca tgg ctc agt gtg cag aca gcc gca ccc	1776
Phe Pro Gly Ala Arg Val Pro Trp Leu Ser Val Gln Thr Ala Ala Pro	
580 585 590	
tca cca ctg cgc ctc atg gat cta ctc tcc aag aag cac ccg ctg gac	1824
Ser Pro Leu Arg Leu Met Asp Leu Leu Ser Lys Lys His Pro Leu Asp	
595 600 605	
aca ctg ttc ctg ctg gcc ggg cca gac acg gtg ctc acg cct gac ttc	1872
Thr Leu Phe Leu Leu Ala Gly Pro Asp Thr Val Leu Thr Pro Asp Phe	
610 615 620	
ctg aac cgc tgc cgc atg cat gcc atc tcc ggc tgg cag gcc ttc ttt	1920

Met Arg Ala Ser Leu Leu Ser Val Leu Arg Pro Ala Gly Pro Val
1 5 10 15

Ala Val Gly Ile Ser Leu Gly Phe Thr Leu Ser Leu Leu Ser Val Thr
20 25 30

Trp Val Glu Glu Pro Cys Gly Pro Gly Pro Pro Gln Pro Gly Asp Ser
35 40 45

Glu Leu Pro Pro Arg Gly Asn Thr Asn Ala Ala Arg Arg Pro Asn Ser
50 55 60

Val Gln Pro Gly Ala Glu Arg Glu Lys Pro Gly Ala Gly Glu Gly Ala
65 70 75 80

Gly Glu Asn Trp Glu Pro Arg Val Leu Pro Tyr His Pro Ala Gln Pro
85 90 95

Gly Gln Ala Ala Lys Lys Ala Val Arg Thr Arg Tyr Ile Ser Thr Glu
100 105 110

Leu Gly Ile Arg Gln Arg Leu Leu Val Ala Val Leu Thr Ser Gln Thr
115 120 125

Thr Leu Pro Thr Leu Gly Val Ala Val Asn Arg Thr Leu Gly His Arg
130 135 140

Leu Glu Arg Val Val Phe Leu Thr Gly Ala Arg Gly Arg Arg Ala Pro

145	150	155	160
Pro Gly Met Ala Val Val Thr Leu Gly Glu Glu Arg Pro Ile Gly His			
165	170	175	
Leu His Leu Ala Leu Arg His Leu Leu Glu Gln His Gly Asp Asp Phe			
180	185	190	
Asp Trp Phe Phe Leu Val Pro Asp Thr Thr Tyr Thr Glu Ala His Gly			
195	200	205	
Leu Ala Arg Leu Thr Gly His Leu Ser Leu Ala Ser Ala Ala His Leu			
210	215	220	
Tyr Leu Gly Arg Pro Gln Asp Phe Ile Gly Gly Glu Pro Thr Pro Gly			
225	230	235	240
Arg Tyr Cys His Gly Gly Phe Gly Val Leu Leu Ser Arg Met Leu Leu			
245	250	255	
Gln Gln Leu Arg Pro His Leu Glu Gly Cys Arg Asn Asp Ile Val Ser			
260	265	270	
Ala Arg Pro Asp Glu Trp Leu Gly Arg Cys Ile Leu Asp Ala Thr Gly			
275	280	285	
Val Gly Cys Thr Gly Asp His Glu Gly Val His Tyr Ser His Leu Glu			
290	295	300	

Leu Ser Pro Gly Glu Pro Val Gln Glu Gly Asp Pro His Phe Arg Ser
305 310 315 320

Ala Leu Thr Ala His Pro Val Arg Asp Pro Val His Met Tyr Gln Leu
325 330 335

His Lys Ala Phe Ala Arg Ala Glu Leu Glu Arg Thr Tyr Gln Glu Ile
340 345 350

Gln Glu Leu Gln Trp Glu Ile Gln Asn Thr Ser His Leu Ala Val Asp
355 360 365

Gly Asp Arg Ala Ala Ala Trp Pro Val Gly Ile Pro Ala Pro Ser Arg
370 375 380

Pro Ala Ser Arg Phe Glu Val Leu Arg Trp Asp Tyr Phe Thr Glu Gln
385 390 395 400

His Ala Phe Ser Cys Ala Asp Gly Ser Pro Arg Cys Pro Leu Arg Gly
405 410 415

Ala Asp Arg Ala Asp Val Ala Asp Val Leu Gly Thr Ala Leu Glu Glu
420 425 430

Leu Asn Arg Arg Tyr His Pro Ala Leu Arg Leu Gln Lys Gln Gln Leu
435 440 445

Val Asn Gly Tyr Arg Arg Phe Asp Pro Ala Arg Gly Met Glu Tyr Thr
450 455 460

Leu Asp Leu Gln Leu Glu Ala Leu Thr Pro Gln Gly Gly Arg Arg Pro
465 470 475 480

Leu Thr Arg Arg Val Gln Leu Leu Arg Pro Leu Ser Arg Val Glu Ile
485 490 495

Leu Pro Val Pro Tyr Val Thr Glu Ala Ser Arg Leu Thr Val Leu Leu
500 505 510

Pro Leu Ala Ala Ala Glu Arg Asp Leu Ala Pro Gly Phe Leu Glu Ala
515 520 525

Phe Ala Thr Ala Ala Leu Glu Pro Gly Asp Ala Ala Ala Ala Leu Thr
530 535 540

Leu Leu Leu Leu Tyr Glu Pro Arg Gln Ala Gln Arg Val Ala His Ala
545 550 555 560

Asp Val Phe Ala Pro Val Lys Ala His Val Ala Glu Leu Glu Arg Arg
565 570 575

Phe Pro Gly Ala Arg Val Pro Trp Leu Ser Val Gln Thr Ala Ala Pro
580 585 590

Ser Pro Leu Arg Leu Met Asp Leu Leu Ser Lys Lys His Pro Leu Asp
595 600 605

Thr Leu Phe Leu Leu Ala Gly Pro Asp Thr Val Leu Thr Pro Asp Phe
610 615 620

Leu Asn Arg Cys Arg Met His Ala Ile Ser Gly Trp Gln Ala Phe Phe
625 630 635 640

Pro Met His Phe Gln Ala Phe His Pro Ala Val Ala Pro Pro Gln Gly
645 650 655

Pro Gly Pro Pro Glu Leu Gly Arg Asp Thr Gly Arg Phe Asp Arg Gln
660 665 670

Ala Ala Ser Glu Ala Cys Phe Tyr Asn Ser Asp Tyr Val Ala Ala Arg
675 680 685

Gly Arg Leu Ala Ala Ala Ser Glu Gln Glu Glu Glu Leu Leu Glu Ser
690 695 700

Leu Asp Val Tyr Glu Leu Phe Leu His Phe Ser Ser Leu His Val Leu
705 710 715 720

Arg Ala Val Glu Pro Ala Leu Leu Gln Arg Tyr Arg Ala Gln Thr Cys
725 730 735

Ser Ala Arg Leu Ser Glu Asp Leu Tyr His Arg Cys Leu Gln Ser Val

740

745

750

Leu Glu Gly Leu Gly Ser Arg Thr Gln Leu Ala Met Leu Leu Phe Glu

755

760

765

Gln Glu Gln Gly Asn Ser Thr

770

775

<210> 5

<211> 1669

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (41)..(1024)

<223>

<400> 5

ctgcgagcgc ctgccccatg cgccgccgcc tctccgcacg atg ttc ccc tcg cgg 55

Met Phe Pro Ser Arg

1

5

agg aaa gcg gcg cag ctg ccc tgg gag gac ggc agg tcc ggg ttg ctc 103

Arg Lys Ala Ala Gln Leu Pro Trp Glu Asp Gly Arg Ser Gly Leu Leu

10

15

20

tcc ggc ggc ctc cct cgg aag tgt tcc gtc ttc cac ctg ttc gtg gcc 151

Ser Gly Gly Leu Pro Arg Lys Cys Ser Val Phe His Leu Phe Val Ala

25

30

35

tgc ctc tcg ctg ggc ttc ttc tcc cta ctc tgg ctg cag ctc agc tgc 199

Cys Leu Ser Leu Gly Phe Phe Ser Leu Leu Trp Leu Gln Leu Ser Cys

40

45

50

tct ggg gac gig gcc cgg gca gtc agg gga caa ggg cag gag acc tcg 247

Ser Gly Asp Val Ala Arg Ala Val Arg Gly Gln Gly Gln Glu Thr Ser

55

60

65

ggc cct ccc cgc gcc tgc ccc cca gag ccg ccc cct gag cac tgg gaa	295
Gly Pro Pro Arg Ala Cys Pro Pro Glu Pro Pro Pro Glu His Trp Glu	
70 75 80 85	
gaa gac gca tcc tgg ggc ccc cac cgc ctg gca gtg ctg gtg ccc ttc	343
Glu Asp Ala Ser Trp Gly Pro His Arg Leu Ala Val Leu Val Pro Phe	
90 95 100	
cgc gaa cgc ttc gag gag ctc ctg gtc ttc gtg ccc cac atg cgc cgc	391
Arg Glu Arg Phe Glu Glu Leu Leu Val Phe Val Pro His Met Arg Arg	
105 110 115	
ttc ctg agc agg aag aag atc cgg cac cac atc tac gtg ctc aac cag	439
Phe Leu Ser Arg Lys Lys Ile Arg His His Ile Tyr Val Leu Asn Gln	
120 125 130	
gtg gac cac ttc agg ttc aac cgg gca gcg ctc atc aac gtg ggc ttc	487
Val Asp His Phe Arg Phe Asn Arg Ala Ala Leu Ile Asn Val Gly Phe	
135 140 145	
ctg gag agc agc aac agc acg gac tac att gcc atg cac gac gtt gac	535
Leu Glu Ser Ser Asn Ser Thr Asp Tyr Ile Ala Met His Asp Val Asp	
150 155 160 165	
ctg ctc cct ctc aac gag gag ctg gac tat ggc ttt cct gag gct ggg	583
Leu Leu Pro Leu Asn Glu Glu Leu Asp Tyr Gly Phe Pro Glu Ala Gly	
170 175 180	
ccc ttc cac gtg gcc tcc ccg gag ctc cac cct ctc tac cac tac aag	631
Pro Phe His Val Ala Ser Pro Glu Leu His Pro Leu Tyr His Tyr Lys	
185 190 195	
acc tat gtc ggc ggc atc ctg ctg ctc tcc aag cag cac tac cgg ctg	679
Thr Tyr Val Gly Gly Ile Leu Leu Leu Ser Lys Gln His Tyr Arg Leu	
200 205 210	
tgc aat ggg atg tcc aac cgc ttc tgg ggc tgg ggc cgc gag gac gac	727
Cys Asn Gly Met Ser Asn Arg Phe Trp Gly Trp Gly Arg Glu Asp Asp	
215 220 225	
gag ttc tac cgg cgc att aag gga gct ggg ctc cag ctt ttc cgc ccc	775
Glu Phe Tyr Arg Arg Ile Lys Gly Ala Gly Leu Gln Leu Phe Arg Pro	
230 235 240 245	
tcg gga atc aca act ggg tac aag aca ttt cgc cac ctg cac gac cca	823
Ser Gly Ile Thr Thr Gly Tyr Lys Thr Phe Arg His Leu His Asp Pro	
250 255 260	
gcc tgg cgg aag agg gac cag aag cgc atc gca gct caa aaa cag gag	871

Ala Trp Arg Lys Arg Asp Gln Lys Arg Ile Ala Ala Gln Lys Gln Glu
 265 270 275
 cag ttc aag gtg gac agg gag gga ggc ctg aac act gtg aag tac cat 919
 Gln Phe Lys Val Asp Arg Glu Gly Gly Leu Asn Thr Val Lys Tyr His
 280 285 290
 gtg gct tcc cgc act gcc ctg tct gtg ggc ggg gcc ccc tgc act gtc 967
 Val Ala Ser Arg Thr Ala Leu Ser Val Gly Gly Ala Pro Cys Thr Val
 295 300 305
 ctc aac atc atg ttg gac tgt gac aag acc gcc aca ccc tgg tgc aca 1015
 Leu Asn Ile Met Leu Asp Cys Asp Lys Thr Ala Thr Pro Trp Cys Thr
 310 315 320 325
 ttc agc tga gctggatgga cagtgaggaa gcctgtacct acaggccata 1064
 Phe Ser
 ttgctcaggc tcaggacaag gcctcaggtc gtgggcccag ctctgacagg atgtggagtg 1124
 gccaggacca agacagcaag ctacgcaatt gcagccaccc ggccgccaag gcaggcttgg 1184
 gcctgggcccag gacacgtggg gtgcctggga cgctgcttgc catgcacagt gatcagagag 1244
 aggctgggggt gtgtcctgtc cgggaccccc cctgccttcc tgcacacct actcigacct 1304
 ccttcacgtg cccaggcctg tgggtagtgg ggagggtga acaggacaac ctctcatcac 1364
 ccccatitit gtctcttctt gctgggctgc ctctgtcaga gacacagtgt agggggccaig 1424
 cagctggcgt aggtggcagt tgggcctggg gaggggtagg acttcagaaa ccagagcaca 1484
 agccccacag agggggaaca gccagcaccg ctctagctgg ttgttgccat gccggaatgt 1544
 gggcctagt ttgccagatc ttctgatitit tcgaaagaaa ctagaatgct ggattcttaa 1604
 gtgatatctt ctgatititit aaatgatagc acctaaatga aactttcaaa aagtaaaaaa 1664
 aaaaa 1669

<210> 6

<211> 327

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

Met Phe Pro Ser Arg Arg Lys Ala Ala Gln Leu Pro Trp Glu Asp Gly
 1 5 10 15

Arg Ser Gly Leu Leu Ser Gly Gly Leu Pro Arg Lys Cys Ser Val Phe

20

25

30

His Leu Phe Val Ala Cys Leu Ser Leu Gly Phe Phe Ser Leu Leu Trp
 35 40 45

Leu Gln Leu Ser Cys Ser Gly Asp Val Ala Arg Ala Val Arg Gly Gln
 50 55 60

Gly Gln Glu Thr Ser Gly Pro Pro Arg Ala Cys Pro Pro Glu Pro Pro
 65 70 75 80

Pro Glu His Trp Glu Glu Asp Ala Ser Trp Gly Pro His Arg Leu Ala
 85 90 95

Val Leu Val Pro Phe Arg Glu Arg Phe Glu Glu Leu Leu Val Phe Val
 100 105 110

Pro His Met Arg Arg Phe Leu Ser Arg Lys Lys Ile Arg His His Ile
 115 120 125

Tyr Val Leu Asn Gln Val Asp His Phe Arg Phe Asn Arg Ala Ala Leu
 130 135 140

Ile Asn Val Gly Phe Leu Glu Ser Ser Asn Ser Thr Asp Tyr Ile Ala
 145 150 155 160

Met His Asp Val Asp Leu Leu Pro Leu Asn Glu Glu Leu Asp Tyr Gly
 165 170 175

Phe Pro Glu Ala Gly Pro Phe His Val Ala Ser Pro Glu Leu His Pro
180 185 190

Leu Tyr His Tyr Lys Thr Tyr Val Gly Gly Ile Leu Leu Leu Ser Lys
195 200 205

Gln His Tyr Arg Leu Cys Asn Gly Met Ser Asn Arg Phe Trp Gly Trp
210 215 220

Gly Arg Glu Asp Asp Glu Phe Tyr Arg Arg Ile Lys Gly Ala Gly Leu
225 230 235 240

Gln Leu Phe Arg Pro Ser Gly Ile Thr Thr Gly Tyr Lys Thr Phe Arg
245 250 255

His Leu His Asp Pro Ala Trp Arg Lys Arg Asp Gln Lys Arg Ile Ala
260 265 270

Ala Gln Lys Gln Glu Gln Phe Lys Val Asp Arg Glu Gly Gly Leu Asn
275 280 285

Thr Val Lys Tyr His Val Ala Ser Arg Thr Ala Leu Ser Val Gly Gly
290 295 300

Ala Pro Cys Thr Val Leu Asn Ile Met Leu Asp Cys Asp Lys Thr Ala
305 310 315 320

Thr Pro Trp Cys Thr Phe Ser
325

<210> 7

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: 5' primer for PCR (K3)

<400> 7

cccaagcttg ccgaggggga gcccga

26

<210> 8

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: 3' primer for PCR (K3)

<400> 8

gctctagact gtcaggagag agttcgatt

29

<210> 9

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: 5' primer for PCR (K3)

<400> 9

atggctgtgc gctctcgccg cccgt

25

<210> 10
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: 3' primer for PCR (K3)

<400> 10
cgccccgct gccgttgtgg ctact

25

<210> 11
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: 5' primer for PCR (K3)

<400> 11
agtagccaca acggcagcgg ggacg

25

<210> 12
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: 3' primer for PCR (K3)

<400> 12
tcaggagaga gticgattgt acct

24

<210> 13
<211> 28
<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: 5' primer for PCR (K11)

<400> 13

ggaattccgg ccaggccgcc aaaaaggc

28

<210> 14

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: 3' primer for PCR (K11)

<400> 14

cgggatcctc aggtgctgtt gccctgctcc

30

<210> 15

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthesised substance for assay

<400> 15

Val Leu Pro Gln Glu Glu Glu Gly Ser Gly Gly Gly Gln Leu Val Thr
1 5 10 15

<210> 16

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: 5' primer for PCR and sequencing (K3 exon 1)

<400> 16

cgacagccca gcgagcgtcc

20

<210> 17

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: 3' primer for PCR and sequencing (K3 exon 1)

<400> 17

ggagactggc aggctggaaa gc

22

<210> 18

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Primer for sequencing (K3 exon 1)

<400> 18

agggggagcc cgaggaggag

20

<210> 19

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Primer for sequencing (K3 exon 1)

<400> 19

ctcctcctcg ggctccccct

20

<210> 20

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: 5' primer for PCR and sequencing (K3 exon 2)

<400> 20

gagacatagt aattgttgcc tttcttt

27

<210> 21

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: 3' primer for PCR and sequencing (K3 exon 2)

<400> 21

gtgaacattt tcatcacagc tccat

25

<210> 22

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: 5' primer for PCR and sequencing (K3 exon 3)

<400> 22

tagatgcttt agtttatcgc tggttt

26

<210> 23

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: 3' primer for PCR and sequencing (K3 exon 3)

<400> 23

ttaaaaaagg caaaatgtgt tgcctg

26

<210> 24

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Primer for sequencing (K3 exon 3)

<400> 24

tctatactca gcagctgaga acca

24

<210> 25

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Primer for sequencing (K3 exon 3)

<400> 25

tggttctcag ctgctgagta taga

24

<210> 26

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Primer for sequencing (K3 exon 3)

<400> 26

gaaatgggag ggcacaatga aaag

24

<210> 27

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Primer for sequencing (K3 exon 3)

<400> 27

cttttcattg tgccctccca tttc

24

<210> 28

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Primer for sequencing (K3 exon 3)

n 3)

<400> 28

tagccagtat gacccaaagg taac

24

<210> 29

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Primer for sequencing (K3 exon 3)

<400> 29

gttacctttg ggtcatactg gcta

24

<210> 30

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Primer for sequencing (K3 exon 3)

<400> 30

aggccattca gaagccaaga agtaggagtg g

31

<210> 31

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Primer for sequencing (K3 exon 3)

<400> 31
ccactccctac ttcttggctt ctgaatggcc t 31

<210> 32
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: 5' primer for PCR and sequencing (K11 exon 1)

<400> 32
tcggagactc ctctggctgc t 21

<210> 33
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: 3' primer for PCR and sequencing (K11 exon 1)

<400> 33
tagagcgggc gcagccgac a 21

<210> 34
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: 5' primer for PCR and sequencing (K11 exon 2)

- <400> 34
tttgataagc ttgtgccatc tcctc 25
- <210> 35
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial
- <220>
<223> Description of Artificial Sequence: 3' primer for PCR and sequencing (K11 exon 2)
- <400> 35
aggtatcagt gggatagctt atcat 25
- <210> 36
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial
- <220>
<223> Description of Artificial Sequence: 5' primer for PCR and sequencing (K11 exon 3)
- <400> 36
agctcatcac agatcccttc cctt 24
- <210> 37
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial
- <220>
<223> Description of Artificial Sequence: 3' primer for PCR and sequencing (K11 exon 1)
- <400> 37

actctgccac ccccagacct ag

22

<210> 38

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: 5' primer for PCR and sequencing (K11 exon 4)

<400> 38

ttgctgatgg cctgtttctc tgat

24

<210> 39

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: 3' primer for PCR and sequencing (K11 exon 4)

<400> 39

gtgtggccat gccacggccc a

21

<210> 40

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Primer for sequencing (K11 exon 4)

<400> 40

tatgtcactg aggccctcacg tct

23

<210> 41
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Primer for sequencing (K11 exon 4)

<400> 41
agacgtgagg cctcagtgac ata 23

<210> 42
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer for sequencing (K11 exon 4)

<400> 42
atgcatttcc aagccttcca ccca 24

<210> 43
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Primer for sequencing (K11 exon 4)

<400> 43
tgggtggaag gcttggaaat gcat 24

<210> 44
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: 5' primer for PCR and sequencing (beta4Gal-T7 exon 1)

<400> 44
tgcgagcggc tgccccaatgc 20

<210> 45
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: 3' primer for PCR and sequencing (beta4Gal-T7 exon 1)

<400> 45
gatggcctcg ggttcccaga tt 22

<210> 46
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: 5' primer for PCR and sequencing (beta4Gal-T7 exon 2)

<400> 46
tcctgaccct gtcccgcgct t 21

<210> 47

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: 3' primer for PCR and sequencing (beta4Gal-T7 exon 2)

<400> 47

aggggtgccg aggggagagg

20

<210> 48

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: 5' primer for PCR and sequencing (beta4Gal-T7 exon 3)

<400> 48

ctgcccagcc ttgcccaccc t

21

<210> 49

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: 3' primer for PCR and sequencing (beta4Gal-T7 exon 3)

<400> 49

gctctgagca gagcaggctg tc

22

<210> 50

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: 5' primer for PCR and sequencing (beta4Gal-T7 exon 4)

<400> 50

agatgggccg agtgacgctg ct

22

<210> 51

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: 3' primer for PCR and sequencing (beta4Gal-T7 exon 4)

<400> 51

ctcagggcag ccaccgcagc t

21

<210> 52

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: 5' primer for PCR and sequencing (beta4Gal-T7 exon 5)

<400> 52

aagggcagcc tgaccccgac tt

22

<210> 53

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: 3' primer for PCR and sequencing (beta4Gal-T7 exon 5)

<400> 53

atgaccacct atccgtcccc aat

23

<210> 54

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: 5' primer for PCR and sequencing (beta4Gal-T7 exon 6)

<400> 54

cagccctgag tccgtgctct tt

22

<210> 55

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: 3' primer for PCR and sequencing (beta4Gal-T7 exon 6)

<220>

<221> misc_feature

<223> Description of Artificial Sequence: 3' primer for PCR and sequencing (beta4Gal-T7 exon 6)

<400> 55

tggcctgtag gtacaggcct cct

23

<210> 56

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: 5' primer for RT-PCR (K3)

<400> 56

cccagaaaaa gtccttcatg atg

23

<210> 57

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: 3' primer for RT-PCR (K3)

<400> 57

aacicttcta attgtcacc ttgatgtag

30

<210> 58

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Probe for RT-PCR (K3)

<400> 58

atgagtgggt catgcgc

17

<210> 59

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: 5' primer for RT-PCR (K11)

<400> 59

gctgaactgg aacgcacgta

20

<210> 60

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: 3' primer for RT-PCR (K11)

<400> 60

cgggatggtg ctggaatac

19

<210> 61

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Probe for RT-PCR (K11)

<400> 61

agatccagga gttacagtgg

20

<210> 62

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: 5' primer for RT-PCR (beta4Gal-T7)

<400> 62

cggcgcatta agggagct

18

<210> 63

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: 3' primer for RT-PCR (beta4Gal-T7)

<400> 63

tacccagttg tgattcccga g

21

<210> 64

<211> 14

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Probe for RT-PCR (beta4Gal-T7)

<400> 64

ciccagcttt tccg

14

<210> 65

<211> 2652

<212> DNA

<213> mouse

<220>

<221> CDS

<222> (1).. (2652)

<223>

<400> 65

atg gcc gtg cgc tcc cgc cgc cca tgg gtg agc gtg gca ttg ggg ttg	48
Met Ala Val Arg Ser Arg Arg Pro Trp Val Ser Val Ala Leu Gly Leu	
1 5 10 15	
gtc ctg ggc ttc acc gcc gcg tcc tgg ctc atc gcc ccc cgg gtg gcc	96
Val Leu Gly Phe Thr Ala Ala Ser Trp Leu Ile Ala Pro Arg Val Ala	
20 25 30	
gag ctg agc gag aag agg cga cgc gcc tcc agt ctt tgc tcc tac tac	144
Glu Leu Ser Glu Lys Arg Arg Arg Gly Ser Ser Leu Cys Ser Tyr Tyr	
35 40 45	
ggc cgc tcg gct acc ggg ccc cgc gcg gac gcg cag cag ctg ctc ccc	192
Gly Arg Ser Ala Thr Gly Pro Arg Ala Asp Ala Gln Gln Leu Leu Pro	
50 55 60	
caa ccc cag tcc cgg ccg cgg cta gag cag tcg ccg ccc cct gcc agc	240
Gln Pro Gln Ser Arg Pro Arg Leu Glu Gln Ser Pro Pro Pro Ala Ser	
65 70 75 80	
cac gag ctc ccc ggt cct cag cag ccg gag gcg gcg ccc gga ggt ccc	288
His Glu Leu Pro Gly Pro Gln Gln Pro Glu Ala Ala Pro Gly Gly Pro	
85 90 95	
agt ttt cgg agc agc ccc tgg cag cag ccg gct ctg ttg ccg cag agg	336
Ser Phe Arg Ser Ser Pro Trp Gln Gln Pro Ala Leu Leu Pro Gln Arg	
100 105 110	
agg cga gga cac acg ccc gaa ggt gcg acg gcg ctt ccc ggc gct ccg	384
Arg Arg Gly His Thr Pro Glu Gly Ala Thr Ala Leu Pro Gly Ala Pro	
115 120 125	
gct gcc aaa ggg gaa cca gag gag gag gat ggg ggc gcg gct gac cct	432
Ala Ala Lys Gly Glu Pro Glu Glu Glu Asp Gly Gly Ala Ala Asp Pro	
130 135 140	
cgg aag ggt ggc cgg ccg ggg agc agc cac aac ggc agc ggg gac ggg	480
Arg Lys Gly Gly Arg Pro Gly Ser Ser His Asn Gly Ser Gly Asp Gly	
145 150 155 160	
ggt gcc gct gtc ccg acc tcc gga ccc ggg gac ttc ctg tac gtg ggt	528
Gly Ala Ala Val Pro Thr Ser Gly Pro Gly Asp Phe Leu Tyr Val Gly	
165 170 175	

gtg atg acc gca cag aag tac ctg ggc agt cgc gcg ctg gcc gcg cag	576
Val Met Thr Ala Gln Lys Tyr Leu Gly Ser Arg Ala Leu Ala Ala Gln	
180 185 190	
cgg acc tgg gcg cgc ttc atc cct ggc cgc gtg gag ttc ttt tcc agt	624
Arg Thr Trp Ala Arg Phe Ile Pro Gly Arg Val Glu Phe Phe Ser Ser	
195 200 205	
cag caa tct ccc agt gct gcg ctt ggc cag ccc ccg cca cct ttg cct	672
Gln Gln Ser Pro Ser Ala Ala Leu Gly Gln Pro Pro Pro Pro Leu Pro	
210 215 220	
gtc atc gcg ctg cca ggg gtc gac gat tcc tac cct ccc cag aaa aag	720
Val Ile Ala Leu Pro Gly Val Asp Asp Ser Tyr Pro Pro Gln Lys Lys	
225 230 235 240	
tcc ttc atg atg atc aag tac atg cac gac cac tat ctg gac aag tat	768
Ser Phe Met Met Ile Lys Tyr Met His Asp His Tyr Leu Asp Lys Tyr	
245 250 255	
gag tgg ttc atg cgc gcc gac gac gat gtc tac atc aaa ggt gat aag	816
Glu Trp Phe Met Arg Ala Asp Asp Asp Val Tyr Ile Lys Gly Asp Lys	
260 265 270	
tta gaa gaa ttt cta aga tcc cta aat agc agc aag cct ctc tac ctg	864
Leu Glu Glu Phe Leu Arg Ser Leu Asn Ser Ser Lys Pro Leu Tyr Leu	
275 280 285	
gga cag acg ggc ctg ggc aat act gaa gaa ctt gga aag ctg ggg ctg	912
Gly Gln Thr Gly Leu Gly Asn Thr Glu Glu Leu Gly Lys Leu Gly Leu	
290 295 300	
gag ccc ggg gag aac ttc tgc atg gga gga cct ggc atg atc ttc agc	960
Glu Pro Gly Glu Asn Phe Cys Met Gly Gly Pro Gly Met Ile Phe Ser	
305 310 315 320	
aga gag gtt ctc agg cgg atg gtg cct cat atc ggc gaa tgc ctc cga	1008
Arg Glu Val Leu Arg Arg Met Val Pro His Ile Gly Glu Cys Leu Arg	
325 330 335	
gag atg tac acc aca cac gaa gac gta gaa gta gga agg tgt gtt cgc	1056
Glu Met Tyr Thr Thr His Glu Asp Val Glu Val Gly Arg Cys Val Arg	
340 345 350	
cgt ttc ggc ggg acg cag tgt gtc tgg tct tat gag atg cag cag ctg	1104
Arg Phe Gly Gly Thr Gln Cys Val Trp Ser Tyr Glu Met Gln Gln Leu	
355 360 365	
ttc cat gaa aac tac gaa cac aat cgc aag ggt tac atc caa gac ctc	1152

Phe	His	Glu	Asn	Tyr	Glu	His	Asn	Arg	Lys	Gly	Tyr	Ile	Gln	Asp	Leu		
370						375					380						
cac	aac	agc	aaa	atc	cac	gca	gcc	atc	acg	ctc	cat	ccg	aac	aaa	agg	1200	
His	Asn	Ser	Lys	Ile	His	Ala	Ala	Ile	Thr	Leu	His	Pro	Asn	Lys	Arg		
385					390					395					400		
ccc	gcg	tac	cag	tac	aga	ctt	cat	aac	tac	atg	ctc	agc	cgc	aag	atc	1248	
Pro	Ala	Tyr	Gln	Tyr	Arg	Leu	His	Asn	Tyr	Met	Leu	Ser	Arg	Lys	Ile		
				405					410					415			
tcc	gag	ctc	cgc	tac	cgc	acc	atc	cag	ctc	cac	cgg	gag	agc	gct	ctc	1296	
Ser	Glu	Leu	Arg	Tyr	Arg	Thr	Ile	Gln	Leu	His	Arg	Glu	Ser	Ala	Leu		
			420					425					430				
atg	agc	aag	ctc	agc	aac	agt	gaa	gtg	agc	aaa	gag	gac	caa	cag	ctg	1344	
Met	Ser	Lys	Leu	Ser	Asn	Ser	Glu	Val	Ser	Lys	Glu	Asp	Gln	Gln	Leu		
		435					440					445					
gga	agg	acg	ccg	tcc	ttc	aac	cac	ttc	cag	cct	cgg	gag	aga	aat	gaa	1392	
Gly	Arg	Thr	Pro	Ser	Phe	Asn	His	Phe	Gln	Pro	Arg	Glu	Arg	Asn	Glu		
	450					455					460						
gtc	atg	gag	tgg	gag	ttc	ctg	acg	ggg	aag	ctg	ctt	tac	tca	gct	gca	1440	
Val	Met	Glu	Trp	Glu	Phe	Leu	Thr	Gly	Lys	Leu	Leu	Tyr	Ser	Ala	Ala		
465					470					475				480			
gag	aac	cag	cct	cct	cga	cag	agc	atc	aac	agc	atc	cta	agg	tca	gct	1488	
Glu	Asn	Gln	Pro	Pro	Arg	Gln	Ser	Ile	Asn	Ser	Ile	Leu	Arg	Ser	Ala		
				485					490					495			
ctg	gat	gac	act	gtc	ctg	cag	gtg	atg	gag	atg	atc	aac	gag	aat	gcc	1536	
Leu	Asp	Asp	Thr	Val	Leu	Gln	Val	Met	Glu	Met	Ile	Asn	Glu	Asn	Ala		
			500					505					510				
aag	agt	agg	ggc	cga	ctc	atc	gac	ttc	aag	gaa	att	cag	tat	ggc	tac	1584	
Lys	Ser	Arg	Gly	Arg	Leu	Ile	Asp	Phe	Lys	Glu	Ile	Gln	Tyr	Gly	Tyr		
		515					520					525					
cgc	agg	gtt	gat	ccc	atg	cac	ggg	gtt	gag	tac	ata	ttg	gac	ctg	cta	1632	
Arg	Arg	Val	Asp	Pro	Met	His	Gly	Val	Glu	Tyr	Ile	Leu	Asp	Leu	Leu		
	530					535					540						
ctc	ctg	tac	aaa	agg	cac	aaa	gga	agg	aaa	ctg	act	gtg	cct	gtg	agg	1680	
Leu	Leu	Tyr	Lys	Arg	His	Lys	Gly	Arg	Lys	Leu	Thr	Val	Pro	Val	Arg		
545					550					555				560			
cgc	cat	gcc	tat	ctt	cag	cag	cca	ttt	agc	aag	cct	ttc	ttc	aga	gag	1728	
Arg	His	Ala	Tyr	Leu	Gln	Gln	Pro	Phe	Ser	Lys	Pro	Phe	Phe	Arg	Glu		

565	570	575	
gtg gaa gaa ctc gac gtc aac cgt ctg gtg gag agt atc aac agc ggt			1776
Val Glu Glu Leu Asp Val Asn Arg Leu Val Glu Ser Ile Asn Ser Gly			
580	585	590	
aca cag tca ttc tcc gtt ata tcc aat tct cta aaa att ctc tct tct			1824
Thr Gln Ser Phe Ser Val Ile Ser Asn Ser Leu Lys Ile Leu Ser Ser			
595	600	605	
ctt caa gag gcc aaa gac ata gga ggg cac aat gaa aag aaa gta cac			1872
Leu Gln Glu Ala Lys Asp Ile Gly Gly His Asn Glu Lys Lys Val His			
610	615	620	
att ctc gtt cca ctc gtt gga agg tac gac att ttc ttg aga ttc atg			1920
Ile Leu Val Pro Leu Val Gly Arg Tyr Asp Ile Phe Leu Arg Phe Met			
625	630	635	640
gaa aat ttt gaa agt acg tgt ctt atc cca aag caa aat gtc aag ctt			1968
Glu Asn Phe Glu Ser Thr Cys Leu Ile Pro Lys Gln Asn Val Lys Leu			
645	650	655	
gtc atc atc ctt ttc agc agg gat gct ggc caa gag tcc atc aag cac			2016
Val Ile Ile Leu Phe Ser Arg Asp Ala Gly Gln Glu Ser Ile Lys His			
660	665	670	
att gag ctg ata caa gaa tat cag agc agg tat ccc agt gca gaa atg			2064
Ile Glu Leu Ile Gln Glu Tyr Gln Ser Arg Tyr Pro Ser Ala Glu Met			
675	680	685	
atg ctc att ccc atg aag gga gag ttt tcc aga ggt ctt ggt ctt gaa			2112
Met Leu Ile Pro Met Lys Gly Glu Phe Ser Arg Gly Leu Gly Leu Glu			
690	695	700	
atg gct tct tcc cag ttt gac aat gac aca ttg ctg cta ttt tgt gat			2160
Met Ala Ser Ser Gln Phe Asp Asn Asp Thr Leu Leu Leu Phe Cys Asp			
705	710	715	720
gtt gac ttg att ttc aga gga gac ttc ctc caa cgc tgt cga gac aat			2208
Val Asp Leu Ile Phe Arg Gly Asp Phe Leu Gln Arg Cys Arg Asp Asn			
725	730	735	
aca gtt cag gga caa cag gta tat tac ccc atc atc ttt agc cag tat			2256
Thr Val Gln Gly Gln Gln Val Tyr Tyr Pro Ile Ile Phe Ser Gln Tyr			
740	745	750	
gac cca aag gtc acc cat atg aga aat cct ccc aca gag ggt gac ttt			2304
Asp Pro Lys Val Thr His Met Arg Asn Pro Pro Thr Glu Gly Asp Phe			
755	760	765	

gta ttc tca aag gaa act ggg ttt tgg aga gac tat ggc tac gga atc 2352
 Val Phe Ser Lys Glu Thr Gly Phe Trp Arg Asp Tyr Gly Tyr Gly Ile
 770 775 780
 aca tgc att tac aaa agc gat cta ctg ggt gca ggt gga ttt gat acc 2400
 Thr Cys Ile Tyr Lys Ser Asp Leu Leu Gly Ala Gly Gly Phe Asp Thr
 785 790 795 800
 tca ata caa ggc tgg gga ctg gaa gat gta gat ctc tat aat aaa gtc 2448
 Ser Ile Gln Gly Trp Gly Leu Glu Asp Val Asp Leu Tyr Asn Lys Val
 805 810 815
 atc cta tct ggc tta cgg ccc ttc aga agt caa gaa gtg gga gtg gtg 2496
 Ile Leu Ser Gly Leu Arg Pro Phe Arg Ser Gln Glu Val Gly Val Val
 820 825 830
 cat att ttc cat cct gtt cat tgt gat cct aac ttg gac cct aag cag 2544
 His Ile Phe His Pro Val His Cys Asp Pro Asn Leu Asp Pro Lys Gln
 835 840 845
 tat aag atg tgc tta gga tcc aaa gca agt act ttt gcc tca acc atg 2592
 Tyr Lys Met Cys Leu Gly Ser Lys Ala Ser Thr Phe Ala Ser Thr Met
 850 855 860
 caa ctg gct gaa ctc tgg ita gaa aaa cat ttg ggt gtc agg gat aat 2640
 Gln Leu Ala Glu Leu Trp Leu Glu Lys His Leu Gly Val Arg Asp Asn
 865 870 875 880
 cga act ctc tcc 2652
 Arg Thr Leu Ser

<210> 66
 <211> 884
 <212> PRT
 <213> mouse

<400> 66

Met Ala Val Arg Ser Arg Arg Pro Trp Val Ser Val Ala Leu Gly Leu
 1 5 10 15

Val Leu Gly Phe Thr Ala Ala Ser Trp Leu Ile Ala Pro Arg Val Ala
 20 25 30

Glu Leu Ser Glu Lys Arg Arg Arg Gly Ser Ser Leu Cys Ser Tyr Tyr
35 40 45

Gly Arg Ser Ala Thr Gly Pro Arg Ala Asp Ala Gln Gln Leu Leu Pro
50 55 60

Gln Pro Gln Ser Arg Pro Arg Leu Glu Gln Ser Pro Pro Pro Ala Ser
65 70 75 80

His Glu Leu Pro Gly Pro Gln Gln Pro Glu Ala Ala Pro Gly Gly Pro
85 90 95

Ser Phe Arg Ser Ser Pro Trp Gln Gln Pro Ala Leu Leu Pro Gln Arg
100 105 110

Arg Arg Gly His Thr Pro Glu Gly Ala Thr Ala Leu Pro Gly Ala Pro
115 120 125

Ala Ala Lys Gly Glu Pro Glu Glu Glu Asp Gly Gly Ala Ala Asp Pro
130 135 140

Arg Lys Gly Gly Arg Pro Gly Ser Ser His Asn Gly Ser Gly Asp Gly
145 150 155 160

Gly Ala Ala Val Pro Thr Ser Gly Pro Gly Asp Phe Leu Tyr Val Gly
165 170 175

Val Met Thr Ala Gln Lys Tyr Leu Gly Ser Arg Ala Leu Ala Ala Gln
180 185 190

Arg Thr Trp Ala Arg Phe Ile Pro Gly Arg Val Glu Phe Phe Ser Ser
195 200 205

Gln Gln Ser Pro Ser Ala Ala Leu Gly Gln Pro Pro Pro Pro Leu Pro
210 215 220

Val Ile Ala Leu Pro Gly Val Asp Asp Ser Tyr Pro Pro Gln Lys Lys
225 230 235 240

Ser Phe Met Met Ile Lys Tyr Met His Asp His Tyr Leu Asp Lys Tyr
245 250 255

Glu Trp Phe Met Arg Ala Asp Asp Asp Val Tyr Ile Lys Gly Asp Lys
260 265 270

Leu Glu Glu Phe Leu Arg Ser Leu Asn Ser Ser Lys Pro Leu Tyr Leu
275 280 285

Gly Gln Thr Gly Leu Gly Asn Thr Glu Glu Leu Gly Lys Leu Gly Leu
290 295 300

Glu Pro Gly Glu Asn Phe Cys Met Gly Gly Pro Gly Met Ile Phe Ser
305 310 315 320

Arg Glu Val Leu Arg Arg Met Val Pro His Ile Gly Glu Cys Leu Arg
325 330 335

Glu Met Tyr Thr Thr His Glu Asp Val Glu Val Gly Arg Cys Val Arg
340 345 350

Arg Phe Gly Gly Thr Gln Cys Val Trp Ser Tyr Glu Met Gln Gln Leu
355 360 365

Phe His Glu Asn Tyr Glu His Asn Arg Lys Gly Tyr Ile Gln Asp Leu
370 375 380

His Asn Ser Lys Ile His Ala Ala Ile Thr Leu His Pro Asn Lys Arg
385 390 395 400

Pro Ala Tyr Gln Tyr Arg Leu His Asn Tyr Met Leu Ser Arg Lys Ile
405 410 415

Ser Glu Leu Arg Tyr Arg Thr Ile Gln Leu His Arg Glu Ser Ala Leu
420 425 430

Met Ser Lys Leu Ser Asn Ser Glu Val Ser Lys Glu Asp Gln Gln Leu
435 440 445

Gly Arg Thr Pro Ser Phe Asn His Phe Gln Pro Arg Glu Arg Asn Glu
450 455 460

Val Met Glu Trp Glu Phe Leu Thr Gly Lys Leu Leu Tyr Ser Ala Ala

465	470	475	480
Glu Asn Gln Pro Pro Arg Gln Ser Ile Asn Ser Ile Leu Arg Ser Ala			
	485	490	495
Leu Asp Asp Thr Val Leu Gln Val Met Glu Met Ile Asn Glu Asn Ala			
	500	505	510
Lys Ser Arg Gly Arg Leu Ile Asp Phe Lys Glu Ile Gln Tyr Gly Tyr			
	515	520	525
Arg Arg Val Asp Pro Met His Gly Val Glu Tyr Ile Leu Asp Leu Leu			
	530	535	540
Leu Leu Tyr Lys Arg His Lys Gly Arg Lys Leu Thr Val Pro Val Arg			
545	550	555	560
Arg His Ala Tyr Leu Gln Gln Pro Phe Ser Lys Pro Phe Phe Arg Glu			
	565	570	575
Val Glu Glu Leu Asp Val Asn Arg Leu Val Glu Ser Ile Asn Ser Gly			
	580	585	590
Thr Gln Ser Phe Ser Val Ile Ser Asn Ser Leu Lys Ile Leu Ser Ser			
	595	600	605
Leu Gln Glu Ala Lys Asp Ile Gly Gly His Asn Glu Lys Lys Val His			
610	615	620	

Ile Leu Val Pro Leu Val Gly Arg Tyr Asp Ile Phe Leu Arg Phe Met
625 630 635 640

Glu Asn Phe Glu Ser Thr Cys Leu Ile Pro Lys Gln Asn Val Lys Leu
645 650 655

Val Ile Ile Leu Phe Ser Arg Asp Ala Gly Gln Glu Ser Ile Lys His
660 665 670

Ile Glu Leu Ile Gln Glu Tyr Gln Ser Arg Tyr Pro Ser Ala Glu Met
675 680 685

Met Leu Ile Pro Met Lys Gly Glu Phe Ser Arg Gly Leu Gly Leu Glu
690 695 700

Met Ala Ser Ser Gln Phe Asp Asn Asp Thr Leu Leu Leu Phe Cys Asp
705 710 715 720

Val Asp Leu Ile Phe Arg Gly Asp Phe Leu Gln Arg Cys Arg Asp Asn
725 730 735

Thr Val Gln Gly Gln Gln Val Tyr Tyr Pro Ile Ile Phe Ser Gln Tyr
740 745 750

Asp Pro Lys Val Thr His Met Arg Asn Pro Pro Thr Glu Gly Asp Phe
755 760 765

Val Phe Ser Lys Glu Thr Gly Phe Trp Arg Asp Tyr Gly Tyr Gly Ile
770 775 780

Thr Cys Ile Tyr Lys Ser Asp Leu Leu Gly Ala Gly Gly Phe Asp Thr
785 790 795 800

Ser Ile Gln Gly Trp Gly Leu Glu Asp Val Asp Leu Tyr Asn Lys Val
805 810 815

Ile Leu Ser Gly Leu Arg Pro Phe Arg Ser Gln Glu Val Gly Val Val
820 825 830

His Ile Phe His Pro Val His Cys Asp Pro Asn Leu Asp Pro Lys Gln
835 840 845

Tyr Lys Met Cys Leu Gly Ser Lys Ala Ser Thr Phe Ala Ser Thr Met
850 855 860

Gln Leu Ala Glu Leu Trp Leu Glu Lys His Leu Gly Val Arg Asp Asn
865 870 875 880

Arg Thr Leu Ser

<210> 67

<211> 2490

<212> DNA

<213> mouse

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(2325)

<223>

<400> 67

atg cgg gcg tcg ctg ctg ctg tcc gtg ctg cgg ccc gcg ggg ccc gtg	48
Met Arg Ala Ser Leu Leu Leu Ser Val Leu Arg Pro Ala Gly Pro Val	
1 5 10 15	
gcc gtg ggc atc tct ctg ggc ttc acc ctg agc ctg ctc agc gtc acc	96
Ala Val Gly Ile Ser Leu Gly Phe Thr Leu Ser Leu Leu Ser Val Thr	
20 25 30	
tgg gtg gag gag cct tgc gga ccc ggg ccg ccc caa ccc gga gac tct	144
Trp Val Glu Glu Pro Cys Gly Pro Gly Pro Pro Gln Pro Gly Asp Ser	
35 40 45	
gag ctg ccg ccg cgc ggc aac acc aac gcg gcg cgc cgg ccc aac tcg	192
Glu Leu Pro Pro Arg Gly Asn Thr Asn Ala Ala Arg Arg Pro Asn Ser	
50 55 60	
gtg cag ccc gga tcc gag cgc gag agg ccc ggg gcc ggc gca ggc acc	240
Val Gln Pro Gly Ser Glu Arg Glu Arg Pro Gly Ala Gly Ala Gly Thr	
65 70 75 80	
ggt gag agc tgg gag cct cgt gtc ttg ccc tac cat ccc gcg cag cca	288
Gly Glu Ser Trp Glu Pro Arg Val Leu Pro Tyr His Pro Ala Gln Pro	
85 90 95	
ggc cag gcc acc aag aag gcc gtc aga act cgg tat atc agc acg gag	336
Gly Gln Ala Thr Lys Lys Ala Val Arg Thr Arg Tyr Ile Ser Thr Glu	
100 105 110	
ctg ggc atc agg cag aag ctt ctg gtg gca gtg ctg acc tca caa gcc	384
Leu Gly Ile Arg Gln Lys Leu Leu Val Ala Val Leu Thr Ser Gln Ala	
115 120 125	
acg ttg cct aca ctg ggt gtg gct gta aac cga act ctg gga cac cga	432
Thr Leu Pro Thr Leu Gly Val Ala Val Asn Arg Thr Leu Gly His Arg	
130 135 140	
ctg gag cat gta gtg ttc ctg acc ggt gcg agg ggc cgc cgg aca cct	480
Leu Glu His Val Val Phe Leu Thr Gly Ala Arg Gly Arg Arg Thr Pro	
145 150 155 160	

tca ggc atg gcg gtg gtg gca ctg ggc gaa gag agg ccc atc gga cac	528
Ser Gly Met Ala Val Val Ala Leu Gly Glu Glu Arg Pro Ile Gly His	
165 170 175	
ctg cac ctg gcg ctg cgc cac ctg ctg gag caa cac ggc gat gac ttt	576
Leu His Leu Ala Leu Arg His Leu Leu Glu Gln His Gly Asp Asp Phe	
180 185 190	
gac tgg ttt ttc cta gtg cct gat gcc acc tat act gaa gcg cat gga	624
Asp Trp Phe Phe Leu Val Pro Asp Ala Thr Tyr Thr Glu Ala His Gly	
195 200 205	
ctg gac cgc cta gct ggc cac ctc agc ctt gct tca gca acc cat ctc	672
Leu Asp Arg Leu Ala Gly His Leu Ser Leu Ala Ser Ala Thr His Leu	
210 215 220	
tat ctt ggc cgg ccg cag gac ttc atc ggt gga gat act acc cca ggc	720
Tyr Leu Gly Arg Pro Gln Asp Phe Ile Gly Gly Asp Thr Thr Pro Gly	
225 230 235 240	
cgc tac tgc cac ggg ggc ttt gga gtc ttg ctc tct cgc aca ctg cta	768
Arg Tyr Cys His Gly Gly Phe Gly Val Leu Leu Ser Arg Thr Leu Leu	
245 250 255	
cag caa ctg cgc ccc cac ctg gaa agc tgc cgc aac gac atc gtc agt	816
Gln Gln Leu Arg Pro His Leu Glu Ser Cys Arg Asn Asp Ile Val Ser	
260 265 270	
gct cgc ccg gat gag tgg ttg ggc cgc tgc atc ctt gat gcc aca ggc	864
Ala Arg Pro Asp Glu Trp Leu Gly Arg Cys Ile Leu Asp Ala Thr Gly	
275 280 285	
gtg ggc tgt act ggt gac cac gag gga atg cac tac aac tac ctg gaa	912
Val Gly Cys Thr Gly Asp His Glu Gly Met His Tyr Asn Tyr Leu Glu	
290 295 300	
ctg agc ccc ggg gag cct gta cag gag ggg gac cct cgt ttc cgc agc	960
Leu Ser Pro Gly Glu Pro Val Gln Glu Gly Asp Pro Arg Phe Arg Ser	
305 310 315 320	
gcc ttg aca gcc cat ccc gtg cgt gac cct gig cac atg tac cag ctg	1008
Ala Leu Thr Ala His Pro Val Arg Asp Pro Val His Met Tyr Gln Leu	
325 330 335	
cac aaa gct ttt gcc cgc gct gag ctg gac cgc acg tac cag gag att	1056
His Lys Ala Phe Ala Arg Ala Glu Leu Asp Arg Thr Tyr Gln Glu Ile	
340 345 350	
caa gaa ttg cag tgg gag atc cag aat acc agc cga ctg gct gct gat	1104

Gln	Glu	Leu	Gln	Trp	Glu	Ile	Gln	Asn	Thr	Ser	Arg	Leu	Ala	Ala	Asp	
	355						360					365				
ggg	gag	aga	gcc	tct	gcc	tgg	cca	gtg	ggc	atc	cca	gca	ccg	tct	cgc	1152
Gly	Glu	Arg	Ala	Ser	Ala	Trp	Pro	Val	Gly	Ile	Pro	Ala	Pro	Ser	Arg	
	370					375					380					
cct	gcc	tca	cgc	ttt	gag	gtt	ctg	cgc	tgg	gac	tac	ttc	aca	gaa	caa	1200
Pro	Ala	Ser	Arg	Phe	Glu	Val	Leu	Arg	Trp	Asp	Tyr	Phe	Thr	Glu	Gln	
385					390					395				400		
tac	gcg	ttc	tcc	tgc	gcc	gat	ggc	tct	ccc	cgc	tgc	ccg	ttg	cgt	ggg	1248
Tyr	Ala	Phe	Ser	Cys	Ala	Asp	Gly	Ser	Pro	Arg	Cys	Pro	Leu	Arg	Gly	
			405					410				415				
gcc	gac	cag	gct	gat	gtg	gct	gac	gtc	ctg	ggg	aca	gcc	tta	gag	gag	1296
Ala	Asp	Gln	Ala	Asp	Val	Ala	Asp	Val	Leu	Gly	Thr	Ala	Leu	Glu	Glu	
		420					425				430					
ctc	aac	cgc	cgt	tac	cag	cca	gcg	ctg	cag	ctc	cag	aag	caa	cag	ctg	1344
Leu	Asn	Arg	Arg	Tyr	Gln	Pro	Ala	Leu	Gln	Leu	Gln	Lys	Gln	Gln	Leu	
	435					440					445					
gtg	aac	ggc	tac	cgg	cgt	ttt	gat	cca	gcc	cga	ggc	atg	gag	tac	aca	1392
Val	Asn	Gly	Tyr	Arg	Arg	Phe	Asp	Pro	Ala	Arg	Gly	Met	Glu	Tyr	Thr	
	450					455					460					
cta	gac	ctg	cag	ctg	gaa	gcg	ctg	aca	ccc	cag	ggt	ggc	cgc	tgg	ccc	1440
Leu	Asp	Leu	Gln	Leu	Glu	Ala	Leu	Thr	Pro	Gln	Gly	Gly	Arg	Trp	Pro	
465					470					475				480		
ctc	acc	cgc	agg	gtg	cag	ctc	ctt	cgg	ccc	ttg	agc	cga	gtg	gag	atc	1488
Leu	Thr	Arg	Arg	Val	Gln	Leu	Leu	Arg	Pro	Leu	Ser	Arg	Val	Glu	Ile	
			485					490				495				
ttg	cct	gta	ccc	tat	gtc	acc	gag	gct	tct	cgg	ctc	act	gtg	cta	ctg	1536
Leu	Pro	Val	Pro	Tyr	Val	Thr	Glu	Ala	Ser	Arg	Leu	Thr	Val	Leu	Leu	
		500						505				510				
ccg	ctg	gct	gca	gcg	gaa	cga	gac	ctg	gct	tct	ggc	ttc	tta	gaa	gcc	1584
Pro	Leu	Ala	Ala	Ala	Glu	Arg	Asp	Leu	Ala	Ser	Gly	Phe	Leu	Glu	Ala	
		515					520				525					
ttt	gcc	act	gca	gcc	ctg	gaa	cct	ggt	gat	gca	gca	gcc	ttg	acc	ctg	1632
Phe	Ala	Thr	Ala	Ala	Leu	Glu	Pro	Gly	Asp	Ala	Ala	Ala	Leu	Thr	Leu	
	530					535					540					
ctg	ctg	ctg	tat	gag	cca	cgc	cag	gcc	cag	cgg	gca	gcc	cac	tca	gac	1680
Leu	Leu	Leu	Tyr	Glu	Pro	Arg	Gln	Ala	Gln	Arg	Ala	Ala	His	Ser	Asp	

545	550	555	560	
gtc ttc gca cct gtc aag gcc cac gtg gca gag cta gag cgg cgt ttc				1728
Val Phe Ala Pro Val Lys Ala His Val Ala Glu Leu Glu Arg Arg Phe				
	565	570	575	
cct ggt gcc cgg gtg ccc tgg ctc agt gtg cag aca gca gcg ccc tct				1776
Pro Gly Ala Arg Val Pro Trp Leu Ser Val Gln Thr Ala Ala Pro Ser				
	580	585	590	
cca ctg cgt ctc atg gat ctg ctg tcc aag aag cac cca cta gac act				1824
Pro Leu Arg Leu Met Asp Leu Leu Ser Lys Lys His Pro Leu Asp Thr				
	595	600	605	
ctg ttc ctg ctg gcc ggg cca gac acg gta ctc aca cct gat ttc ctg				1872
Leu Phe Leu Leu Ala Gly Pro Asp Thr Val Leu Thr Pro Asp Phe Leu				
	610	615	620	
aac cgc tgc cgc atg cat gcc atc tct ggc tgg cag gcc ttc ttc ccc				1920
Asn Arg Cys Arg Met His Ala Ile Ser Gly Trp Gln Ala Phe Phe Pro				
625	630	635	640	
atg cac ttc cag gcc ttc cac cct gct gtg gct cct cct cag ggc cct				1968
Met His Phe Gln Ala Phe His Pro Ala Val Ala Pro Pro Gln Gly Pro				
	645	650	655	
ggg cca cca gag ctg ggc cgt gac acc ggt cac ttt gat cgc cag gct				2016
Gly Pro Pro Glu Leu Gly Arg Asp Thr Gly His Phe Asp Arg Gln Ala				
	660	665	670	
gcc agt gag gca tgc ttc tac aac tcc gac tat gtg gcg gcc cgt ggc				2064
Ala Ser Glu Ala Cys Phe Tyr Asn Ser Asp Tyr Val Ala Ala Arg Gly				
	675	680	685	
cgg ctg gtg gcg gcc tcg gag cag gag gag gag ctg ctg gag agc ctg				2112
Arg Leu Val Ala Ala Ser Glu Gln Glu Glu Glu Leu Leu Glu Ser Leu				
	690	695	700	
gat gtg tac gag ttg ttt ctg cgc ttc tcc aac ttg cac gtg ctg aga				2160
Asp Val Tyr Glu Leu Phe Leu Arg Phe Ser Asn Leu His Val Leu Arg				
705	710	715	720	
gca gta gag cca gcc ttg ctg cag cgc tac cgg gcc cag ccg tgc agt				2208
Ala Val Glu Pro Ala Leu Leu Gln Arg Tyr Arg Ala Gln Pro Cys Ser				
	725	730	735	
gca cgg ctc agt gaa gac ctt tac cac cgc tgt cgc cag agc gta ctt				2256
Ala Arg Leu Ser Glu Asp Leu Tyr His Arg Cys Arg Gln Ser Val Leu				
	740	745	750	

gag ggc ctt ggc tcc cgc acc cag ctt gcc atg ctg ctc ttt gag cag 2304
 Glu Gly Leu Gly Ser Arg Thr Gln Leu Ala Met Leu Leu Phe Glu Gln

755

760

765

gaa cag ggg aac agc acc taa gcccctgcac ctgtccctgc tcttccccag 2355

Glu Gln Gly Asn Ser Thr

770

gaacctggag ccacgtgccca gcctcgctgg acagggctgg cgtagcctc agtccttagg 2415

gcagcccact ggtcccttgt ccttgcctt gtiggaccca tgggctcagg acaagccctg 2475

agacagatgc cctag 2490

<210> 68

<211> 774

<212> PRT

<213> mouse

<400> 68

Met Arg Ala Ser Leu Leu Leu Ser Val Leu Arg Pro Ala Gly Pro Val

1

5

10

15

Ala Val Gly Ile Ser Leu Gly Phe Thr Leu Ser Leu Leu Ser Val Thr

20

25

30

Trp Val Glu Glu Pro Cys Gly Pro Gly Pro Pro Gln Pro Gly Asp Ser

35

40

45

Glu Leu Pro Pro Arg Gly Asn Thr Asn Ala Ala Arg Arg Pro Asn Ser

50

55

60

Val Gln Pro Gly Ser Glu Arg Glu Arg Pro Gly Ala Gly Ala Gly Thr

65

70

75

80

Gly Glu Ser Trp Glu Pro Arg Val Leu Pro Tyr His Pro Ala Gln Pro
85 90 95

Gly Gln Ala Thr Lys Lys Ala Val Arg Thr Arg Tyr Ile Ser Thr Glu
100 105 110

Leu Gly Ile Arg Gln Lys Leu Leu Val Ala Val Leu Thr Ser Gln Ala
115 120 125

Thr Leu Pro Thr Leu Gly Val Ala Val Asn Arg Thr Leu Gly His Arg
130 135 140

Leu Glu His Val Val Phe Leu Thr Gly Ala Arg Gly Arg Arg Thr Pro
145 150 155 160

Ser Gly Met Ala Val Val Ala Leu Gly Glu Glu Arg Pro Ile Gly His
165 170 175

Leu His Leu Ala Leu Arg His Leu Leu Glu Gln His Gly Asp Asp Phe
180 185 190

Asp Trp Phe Phe Leu Val Pro Asp Ala Thr Tyr Thr Glu Ala His Gly
195 200 205

Leu Asp Arg Leu Ala Gly His Leu Ser Leu Ala Ser Ala Thr His Leu
210 215 220

Tyr Leu Gly Arg Pro Gln Asp Phe Ile Gly Gly Asp Thr Thr Pro Gly

225 230 235 240

Arg Tyr Cys His Gly Gly Phe Gly Val Leu Leu Ser Arg Thr Leu Leu
245 250 255

Gln Gln Leu Arg Pro His Leu Glu Ser Cys Arg Asn Asp Ile Val Ser
260 265 270

Ala Arg Pro Asp Glu Trp Leu Gly Arg Cys Ile Leu Asp Ala Thr Gly
275 280 285

Val Gly Cys Thr Gly Asp His Glu Gly Met His Tyr Asn Tyr Leu Glu
290 295 300

Leu Ser Pro Gly Glu Pro Val Gln Glu Gly Asp Pro Arg Phe Arg Ser
305 310 315 320

Ala Leu Thr Ala His Pro Val Arg Asp Pro Val His Met Tyr Gln Leu
325 330 335

His Lys Ala Phe Ala Arg Ala Glu Leu Asp Arg Thr Tyr Gln Glu Ile
340 345 350

Gln Glu Leu Gln Trp Glu Ile Gln Asn Thr Ser Arg Leu Ala Ala Asp
355 360 365

Gly Glu Arg Ala Ser Ala Trp Pro Val Gly Ile Pro Ala Pro Ser Arg
370 375 380

Pro Ala Ser Arg Phe Glu Val Leu Arg Trp Asp Tyr Phe Thr Glu Gln
385 390 395 400

Tyr Ala Phe Ser Cys Ala Asp Gly Ser Pro Arg Cys Pro Leu Arg Gly
405 410 415

Ala Asp Gln Ala Asp Val Ala Asp Val Leu Gly Thr Ala Leu Glu Glu
420 425 430

Leu Asn Arg Arg Tyr Gln Pro Ala Leu Gln Leu Gln Lys Gln Gln Leu
435 440 445

Val Asn Gly Tyr Arg Arg Phe Asp Pro Ala Arg Gly Met Glu Tyr Thr
450 455 460

Leu Asp Leu Gln Leu Glu Ala Leu Thr Pro Gln Gly Gly Arg Trp Pro
465 470 475 480

Leu Thr Arg Arg Val Gln Leu Leu Arg Pro Leu Ser Arg Val Glu Ile
485 490 495

Leu Pro Val Pro Tyr Val Thr Glu Ala Ser Arg Leu Thr Val Leu Leu
500 505 510

Pro Leu Ala Ala Ala Glu Arg Asp Leu Ala Ser Gly Phe Leu Glu Ala
515 520 525

Phe Ala Thr Ala Ala Leu Glu Pro Gly Asp Ala Ala Ala Leu Thr Leu
530 535 540

Leu Leu Leu Tyr Glu Pro Arg Gln Ala Gln Arg Ala Ala His Ser Asp
545 550 555 560

Val Phe Ala Pro Val Lys Ala His Val Ala Glu Leu Glu Arg Arg Phe
565 570 575

Pro Gly Ala Arg Val Pro Trp Leu Ser Val Gln Thr Ala Ala Pro Ser
580 585 590

Pro Leu Arg Leu Met Asp Leu Leu Ser Lys Lys His Pro Leu Asp Thr
595 600 605

Leu Phe Leu Leu Ala Gly Pro Asp Thr Val Leu Thr Pro Asp Phe Leu
610 615 620

Asn Arg Cys Arg Met His Ala Ile Ser Gly Trp Gln Ala Phe Phe Pro
625 630 635 640

Met His Phe Gln Ala Phe His Pro Ala Val Ala Pro Pro Gln Gly Pro
645 650 655

Gly Pro Pro Glu Leu Gly Arg Asp Thr Gly His Phe Asp Arg Gln Ala
660 665 670

Ala Ser Glu Ala Cys Phe Tyr Asn Ser Asp Tyr Val Ala Ala Arg Gly
675 680 685

Arg Leu Val Ala Ala Ser Glu Gln Glu Glu Glu Leu Leu Glu Ser Leu
690 695 700

Asp Val Tyr Glu Leu Phe Leu Arg Phe Ser Asn Leu His Val Leu Arg
705 710 715 720

Ala Val Glu Pro Ala Leu Leu Gln Arg Tyr Arg Ala Gln Pro Cys Ser
725 730 735

Ala Arg Leu Ser Glu Asp Leu Tyr His Arg Cys Arg Gln Ser Val Leu
740 745 750

Glu Gly Leu Gly Ser Arg Thr Gln Leu Ala Met Leu Leu Phe Glu Gln
755 760 765

Glu Gln Gly Asn Ser Thr
770

<210> 69
<211> 984
<212> DNA
<213> mouse

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(984)
<223>

<400> 69

atg ttg ccc tcc cgg agg aaa gcg gcg cag ctg ccc tgg gag gat ggc	48
Met Leu Pro Ser Arg Arg Lys Ala Ala Gln Leu Pro Trp Glu Asp Gly	
1 5 10 15	
agg gcc agg ttg ctt cct gga ggc ctc cgc cgg aaa tgc tcc atc ttc	96
Arg Ala Arg Leu Leu Pro Gly Gly Leu Arg Arg Lys Cys Ser Ile Phe	
20 25 30	
cac ctc ttc att gcc ttt ctc ctg ttg gtc ttc ttc tcc ctg ctc tgg	144
His Leu Phe Ile Ala Phe Leu Leu Leu Val Phe Phe Ser Leu Leu Trp	
35 40 45	
ctg cag ctc agc tgt tct gga gat atg gcc cag gtg acc agg gga caa	192
Leu Gln Leu Ser Cys Ser Gly Asp Met Ala Gln Val Thr Arg Gly Gln	
50 55 60	
ggg caa gag acc tcg ggt cca ccc cgg gct tgc cct cca gag ccg ccc	240
Gly Gln Glu Thr Ser Gly Pro Pro Arg Ala Cys Pro Pro Glu Pro Pro	
65 70 75 80	
cct gag cac tgg gaa gaa gat gag tcc tgg ggg ccc cac cgc ttg gca	288
Pro Glu His Trp Glu Glu Asp Glu Ser Trp Gly Pro His Arg Leu Ala	
85 90 95	
gtg ctg gtg ccc ttt cgt gag cgc ttt gag gag ctg ctg gtc ttt gtg	336
Val Leu Val Pro Phe Arg Glu Arg Phe Glu Glu Leu Leu Val Phe Val	
100 105 110	
ccc cac atg cac cgc ttc cta agc agg aag agg atc cag cac cac atc	384
Pro His Met His Arg Phe Leu Ser Arg Lys Arg Ile Gln His His Ile	
115 120 125	
tat gtg ctc aac cag gtg gac cat ttc agg ttc aat cgg gca gca ctc	432
Tyr Val Leu Asn Gln Val Asp His Phe Arg Phe Asn Arg Ala Ala Leu	
130 135 140	
atc aat gtg ggc ttc ctg gag agc agc aac agc aca gac tac atc gcc	480
Ile Asn Val Gly Phe Leu Glu Ser Ser Asn Ser Thr Asp Tyr Ile Ala	
145 150 155 160	
atg cac gat gtg gac ctg ctc cct ctc aat gag gag ctg gac tat ggc	528
Met His Asp Val Asp Leu Leu Pro Leu Asn Glu Glu Leu Asp Tyr Gly	
165 170 175	
ttc ccg gag gct ggg ccc ttc cat gtg gcc tcc cca gag ctc cac cct	576
Phe Pro Glu Ala Gly Pro Phe His Val Ala Ser Pro Glu Leu His Pro	

180	185	190	
ctc tac cac tac aag acc tat gtg ggc ggc att ctg ctg ctg tcc aaa			624
Leu Tyr His Tyr Lys Thr Tyr Val Gly Gly Ile Leu Leu Leu Ser Lys			
195	200	205	
cag cac tac cag ctg tgc aac gga atg tcc aac cgc ttt tgg ggc tgg			672
Gln His Tyr Gln Leu Cys Asn Gly Met Ser Asn Arg Phe Trp Gly Trp			
210	215	220	
ggc cga gag gat gat gaa ttc tac cgg cgc atc aaa gga gct ggc ctc			720
Gly Arg Glu Asp Asp Glu Phe Tyr Arg Arg Ile Lys Gly Ala Gly Leu			
225	230	235	240
cag ctt ttc cgc ccc tcg gga atc aca act ggg tac cag aca ttt cgc			768
Gln Leu Phe Arg Pro Ser Gly Ile Thr Thr Gly Tyr Gln Thr Phe Arg			
245	250	255	
cac tlg cat gac cct gcc tgg cgg aag agg gac caa aaa cgc att gcg			816
His Leu His Asp Pro Ala Trp Arg Lys Arg Asp Gln Lys Arg Ile Ala			
260	265	270	
gct caa aaa cag gaa cag ttc aag gtg gac cgg gag gga ggc ctg aac			864
Ala Gln Lys Gln Glu Gln Phe Lys Val Asp Arg Glu Gly Gly Leu Asn			
275	280	285	
act gtg aag tac cgg gtg gat tcc cgc acg gca ctg tct ata gga ggg			912
Thr Val Lys Tyr Arg Val Asp Ser Arg Thr Ala Leu Ser Ile Gly Gly			
290	295	300	
gcc ccg tgc act gtc ctc aat gtc atg ctg gac tgc gat aaa aca gcc			960
Ala Pro Cys Thr Val Leu Asn Val Met Leu Asp Cys Asp Lys Thr Ala			
305	310	315	320
acc cca tgg tgc ata ttt ggc tga			984
Thr Pro Trp Cys Ile Phe Gly			
325			

<210> 70

<211> 327

<212> PRT

<213> mouse

<400> 70

Met Leu Pro Ser Arg Arg Lys Ala Ala Gln Leu Pro Trp Glu Asp Gly

1	5	10	15
Arg Ala Arg Leu Leu Pro Gly Gly Leu Arg Arg Lys Cys Ser Ile Phe	20	25	30
His Leu Phe Ile Ala Phe Leu Leu Leu Val Phe Phe Ser Leu Leu Trp	35	40	45
Leu Gln Leu Ser Cys Ser Gly Asp Met Ala Gln Val Thr Arg Gly Gln	50	55	60
Gly Gln Glu Thr Ser Gly Pro Pro Arg Ala Cys Pro Pro Glu Pro Pro	65	70	75
Pro Glu His Trp Glu Glu Asp Glu Ser Trp Gly Pro His Arg Leu Ala	85	90	95
Val Leu Val Pro Phe Arg Glu Arg Phe Glu Glu Leu Leu Val Phe Val	100	105	110
Pro His Met His Arg Phe Leu Ser Arg Lys Arg Ile Gln His His Ile	115	120	125
Tyr Val Leu Asn Gln Val Asp His Phe Arg Phe Asn Arg Ala Ala Leu	130	135	140
Ile Asn Val Gly Phe Leu Glu Ser Ser Asn Ser Thr Asp Tyr Ile Ala	145	150	155
			160

Met His Asp Val Asp Leu Leu Pro Leu Asn Glu Glu Leu Asp Tyr Gly
165 170 175

Phe Pro Glu Ala Gly Pro Phe His Val Ala Ser Pro Glu Leu His Pro
180 185 190

Leu Tyr His Tyr Lys Thr Tyr Val Gly Gly Ile Leu Leu Leu Ser Lys
195 200 205

Gln His Tyr Gln Leu Cys Asn Gly Met Ser Asn Arg Phe Trp Gly Trp
210 215 220

Gly Arg Glu Asp Asp Glu Phe Tyr Arg Arg Ile Lys Gly Ala Gly Leu
225 230 235 240

Gln Leu Phe Arg Pro Ser Gly Ile Thr Thr Gly Tyr Gln Thr Phe Arg
245 250 255

His Leu His Asp Pro Ala Trp Arg Lys Arg Asp Gln Lys Arg Ile Ala
260 265 270

Ala Gln Lys Gln Glu Gln Phe Lys Val Asp Arg Glu Gly Gly Leu Asn
275 280 285

Thr Val Lys Tyr Arg Val Asp Ser Arg Thr Ala Leu Ser Ile Gly Gly
290 295 300

Ala Pro Cys Thr Val Leu Asn Val Met Leu Asp Cys Asp Lys Thr Ala
305 310 315 320

Thr Pro Trp Cys Ile Phe Gly
325

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP03/14211

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N15/00, C12N9/24, 9/38, C12Q1/68, A01K67/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N15/00, C12N9/24, 9/38, C12Q1/68, A01K67/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
GeneBank/EMBL/DDBJ/SwissProt/PIR/GeneSeq,
CA/BIOSIS/WPIDS/MEDLINE (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 5869273 A (BioMarin Pharmaceuticals), 09 February, 1999 (09.02.99), Full text & US 6287789 B1	1-5
A	WO 00/73454 A1 (GENENTECH, INC.), 07 December, 2000 (07.12.00), Claims; example 102; Fig. 233; in particular, P101281 & EP 1210418 A1 & US 2002/137075 A1	4-5
A	JP 2000-312587 A (Seikagaku Corp.), 14 November, 2000 (14.11.00), Full text (Family: none)	4-5

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 09 January, 2004 (09.01.04)	Date of mailing of the international search report 27 January, 2004 (27.01.04)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP03/14211

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Raquel Almeida et al., "Cloning and Expression of a Proteoglycan UDP-Galactose: β -Xylose β 1,4-Galactosyltransferase I", The Journal of Biological Chemistry, 1999, Vol.274(37), pages 26165 to 26171; full text; in particular, Fig. 1	4-5
A	Norihiro KOTANI et al., "Knockout of mouse 1,4-galactosyltransferase-1 gene results in a dramatic shift of outer chain moieties of N-glycans from type 2 to type 1 chains in hepatic membrane and plasma glycoproteins", Biochemical Journal, 2001, Vol.357, pages 827 to 834, full text	5
P,A	Toshikaze YADA et al., "Chondroitin Sulfate Synthase-2", The Journal of Biological Chemistry, 2003, Vol.278(41), pages 39711 to 39725, full text; in particular, GenBank:AB086062	4-5
P,A	Toshikaze YADA et al., "Chondroitin Sulfate Synthase-2", The Journal of Biological Chemistry, 2003, Vol.278(32), pages 30235 to 30247; full text; in particular, GenBank:AB086063	4-5

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12N15/00, C12N9/24, 9/38, C12Q1/68, A01K67/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12N15/00, C12N9/24, 9/38, C12Q1/68, A01K67/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

GeneBank/EMBL/DDBJ/SwissProt/PIR/GeneSeq
CA/BIOSIS/WPIDS/MEDLINE (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	US 5869273 A, (BioMarin Pharmaceuticals) 1999.02.09, 文献全体参照, & US 6287789 B1	1-5
A	WO 00/73454 A1, (GENENTECH, INC.) 2000.12.07, 特許請求の範囲、EXAMPLE 102、FIGURE 233、特にPRO1281等参照, & EP 1210418 A1 & US 2002/137075 A1	4-5
A	JP 2000-312587 A, (生化学工業株式会社) 2000.11.14, 文献全体参照, (ファミリーなし)	4-5

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

09.01.04

国際調査報告の発送日

27.1.2004

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)
郵便番号 100-8915
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

坂崎 恵美子



4N

9461

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	Raquel Almeida et al. "Cloning and Expression of a Proteoglycan UDP-Galactose: β -Xylose β 1,4-Galactosyltransferase I" The Journal of Biological Chemistry, 1999, Vol. 274(37), p. 26165-26171, 文献全体、特にFig1等参照	4-5
A	Norihiro KOTANI et al. "Knockout of mouse 1,4-galactosyltransferase -1 gene results in a dramatic shift of outer chain moieties of N-glycans from type 2 to type 1 chains in hepatic membrane and plasma glycoproteins" Biochemical Journal, 2001, Vol. 357, p. 827-834, 文献全体参照	5
P, A	Toshikaze Yada et al. "Chondroitin Sulfate Synthase-3" The Journal of Biological Chemistry, 2003, Vol. 278(41), p. 39711-39725, 文献全体、特にGenBank : AB086062等参照	4-5
P, A	Toshikaze Yada et al. "Chondroitin Sulfate Synthase-2" The Journal of Biological Chemistry, 2003, Vol. 278(32), p. 30235-30247, 文献全体、特にGenBank : AB086063等参照	4-5